UNTERSUCHUNG DER SEKRETION HETEROLOGER PROTEINE IN DER HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

GERNOT REIPEN
aus Glehn

Düsseldorf 1987

UNIV.
LEIDEN
NBL

UNTERSUCHUNG DER SEKRETION HETEROLOGER PROTEINE IN DER HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Unviversität Düsseldorf
vorgelegt von

GERNOT REIPEN
aus Glehn

Düsseldorf 1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0049

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	11
2.1.	Stämme und Medien	11
2.1.1.	Hefestämme	11
2.1.2.	Anzuchtmedien für Hefe	11
2.1.3.	Bakterienstämme	11
2.1.4.	Anzuchtmedien für Bakterien	11
2.2.	Verwendete Plasmide	12
2.3.	DNA-Präparationen	12
2.3.1.	Plasmid-DNA-Isolierung aus E.coli	12
2.3.2.	Plasmid-DNA-Isolierung aus E.coli Minilysaten	13
2.4.	DNA-Aufreinigung durch Phenol-Extraktion	13
2.5.	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	13
2.6.	DNA-Doppelstrangabbau mit Hilfe der Exonuklease Bal31	13
2.7.	DNA-Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase	14
2.8.	DNA-Ligation	14
2.9.	Gelelektrophorese	14
2.10.	Isolierung von DNA-Fragmneten aus Agarosegelen	14
2.11.	Isolation von DNA-Fragmenten aus "Low-melting Agarose"	15
2.12.	DNA-Sequenzierung	15
2.13.	E.coli Transformation	17
2.14.	Hefetransformation	17
2.14.1.	Nichtselektive Hefetransformation	18
2.15.	Anfertigung von Heferohextrakten	18
2.16.	Fraktionierung von Hefezellen durch Protoplastierung mit Zymolyse	18
2.17.	Jod-Stärke Test zum Nachweis der ß-Lactamase	19
2.18.	Nitrocefintest als quantitativer Nachweis der ß-Lactamaseaktivität	19
2.19.	Proteinbestimmung	19
2.20.	Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PA-Gel)	20
2.21.	Anfärbung von SDS-PA-Gelen mit Coomassie-Blue	20
2.22.	Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse	20
2.23.	Behandlung von Rohextrakten und Kulturmedien mit Endoglycosidase H (EndoH)	21
2.24.	Inkubation von Hefekulturen mit Tunicamycin	21
2.25.	Aktivitätsbestimmung der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6P-DH)	21
2.26.	Concanavalin-A-Säulenchromatographie	22
3.	Ergebnisse	23
3.1.	Das Plasmid pGR1 Ein Hefevektor mit der vollständigen pBR322-Sequenz	23

3.2.	Sekretion der ß-Lactamase in S.cerevisiae mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors	24
3.2.1.	Das Plasmid pGRT1-22 Der Austausch der ß-Lactamasesignalsequenz gegen die Preprosequenz des Alpha-Faktors aus S.cerevisiae	24
3.2.2.	Sequenzierung der Genfusion αFprepro-ß-Lactamase in pGRT1-22	26
3.2.3.	Das Plasmid pGRT1-913 Ein Hefevektor mit intaktem Leseraster innerhalb der αFprepro-ß-Lactamase Genfusion	27
3.2.4	Nachweis aktiver ß-Lactamase im Kulturmedium	28
3.2.5.	Immunologischer Nachweis der ausgeschleusten ß-Lactamase im Kulturtmedium	30
3.2.6.	Untersuchung der ß-Lactamaseinduktion unter Kontrolle des Alpha-Faktor-Promotors in Hefezellen des α und a Paarungstyps	32
3.3.	Untersuchung des Einflußes N-terminaler Aminosäuresequenzen der Invertase auf die ß-Lactamasesekretion in S.cerevisiae	35
3.3.1.	Das Plasmid pINV325 Der Einbau des SUC2-Gens aus pRB58 in pBR325	35
3.3.2.	Untersuchung des SUC2-Gens auf Restriktionsschnittstellen	36
3.3.3.	Konstruktion von Bal31-Deletionen innerhalb des Invertasegens	37
3.3.4.	Der Hefevektor pHVOS Ein Hefevektor konstruiert zum Einbau der deletierten SUC2-DNA-Fragmente	37
3.3.5.	Die Plasmidkonstruktionen pHVOS1 bis pHVOS26 Hefevektoren mit Invertase-ß-Lactamase-Hybridgenen	39
3.3.6	Invertase-ß-Lactamasehybridgene vermitteln Ampicillinresistenz in E.coli	39
3.3.7.	Ermittlung der SUC2-Fragmentgrößen der Plasmide pHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26	41
3.3.8.	Nachweis enzymatisch aktiver ß-Lactamase-hybridproteine in S.cerevisiae	41
3.3.9.	Untersuchung des Kulturmediums der EK1 Transformanten auf ß-Lactamaseaktivität	43
3.3.10.	Immunologischer Nachweis von Invertase-fusionsproteinen im Medium transformierter Hefezellen nach Inkubation des Kulturmediums mit Endoglycosidase H	45
3.3.11.	Immunologische und enzymatische Untersuchung der Lokalisation der Invertase-ß-Lactamasefusionsproteine in GRF18 Transformanten	48
3.3.12.	Nachweis des coreglykosylierten Zwischenprodukts der Invertase-ß-Lactamasefusion in EK1/pHVOS18 Transformanten	52

3.4. Integration der Alpha-Prosequenz innerhalb eines Invertase-ß-Lactamase Hybridproteins führt zur Sekretion enzymatisch aktiver ß-Lactamase 54

3.4.1. Das Plasmid pGRT2-6310 54
Ein Hefevektor mit integrierter Alpha-Prosequenz innerhalb eines Invertase-ß-Lactamase Fusionsgens

3.4.2. Sekretion von ß-Lactamase aus pGRT2-6310 transformierten Hefezellen erfolgt unabhängig vom Paarungstyp und unterliegt der Glucose Regulation 56

3.4.3. Immunologischer Nachweis der ß-Lactamase in Kulturmedien bzw. Rohextrakten von GRF18/pGRT1-913 und GRF18/pGRT2-6310 Transformanten 58

3.4.4. Untersuchung der ß-Lactamaseproteine in Rohextrakten und Kulturmedien von GRF18 Transformanten, transformiert mit den Plasmiden pGRT1-913, pGRT2-6310 und pHVOS18 59

3.5. Untersuchung der Expression der ß-Lactamasehybridgene kodiert durch die Plasmide pGRT1-913 und pGRT2-6310 in kex2 Hefemutanten 63

4. Diskussion 68

4.1 Sekretion der ß-Lactamase mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors 68

4.2. Invertase-ß-Lactamasefusionen zeigen unterschiedliche Sekretionseffifienzen in S.cerevisiae 70

4.3. Die Prosequenz des Alpha-Faktors ist ein Sortiersignal für die Proteinsekretion in S.cerevisiae 75

4.4. Modell der Proteinsekretion in S.cerevisiae 78

5. Zusammenfassung 81

6. Literaturverzeichnis 83

7. Abkürzungen 99

1. EINLEITUNG

Für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen einer Zelle sind die Proteine von essentieller Bedeutung. Zum einen beteiligen sie sich als Strukturproteine am Aufbau komplexer Zellkomponenten, zum anderen regeln sie als Biokatalysatoren den geordneten Ablauf aller biochemischen Vorgänge einer Zelle.

Mit Ausnahme der im Plastid- bzw. Mitochondriengenom kodierten Proteine, erfolgt ihre Synthese entweder im Cytosol an freien Ribosomen oder aber am "rauhen" (d.h. mit Ribosomen besetzten) endoplasmatischen Reticulum (ER); ihre spätere Lokalisation umfaßt jedoch die ganze Zelle. So befinden sich Lipoproteine in Zellmembranen, Histone dagegen innerhalb des Zellkerns eukaryotischer Zellen. Abbauende Enzyme, wie Proteinasen, liegen z.T. in Vakuolen vor, Pheromone hingegen werden aktiv aus der Zelle ausgeschleust. Membranproteine lagern sich selektiv in Biomembranen ein. Die Lokalisation einzelner Proteine kann so spezifisch sein, daß sie als "Marker" für bestimmte Zellkomponenten dienen können. Als Beispiele seien hier die Galactosyltransferase für Membranen des Golgi-Komplexes, Cytochrom-C-Oxidase für die innere mitochondriale Membran und Carboxypeptidase Y für vakuoläre Zellbestandteile der Hefe angeführt.

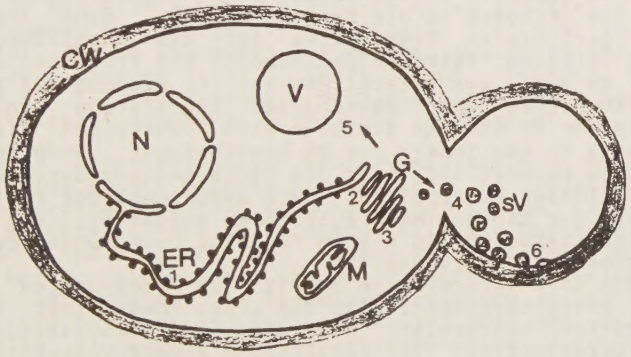


Abb.: 1 Sekretionsweg in S.cerevisiae
1) cotranslationale Translokation ins ER, Ausbildung der Core-Glykosylierung, 2) Transfer vom ER-Lumen zum Golgi-Komplex, 3) Glykosylierung und Sortierung der Proteine, 4) Einschluß in sekretorische Vesikeln und Transport zur Zelloberfläche 5) Transport zu Vakuolen 6) Ausschleusung der Proteine durch den Vorgang der Exocytose. CW = Zellwand, ER = Endoplasmatisches Reticulum, G = Golgi, M = Mitochondrium, N = Zellkern, sV = sekretorische Vesikel, V = Vakuole (nach Schekman und Novick, 1982)

Obwohl in den letzten Jahren die Biosynthese der Proteine sehr intensiv erforscht wurde, gibt es noch zahlreiche ungelöste Probleme bezüglich der Mechanismen, die für die gezielte Translokation der Proteine verantwortlich sind.
In den Sechziger- und Siebziger Jahren konnten die morphologischen Aspekte der Sekretion von Proteinen weitgehend aufgeklärt werden (Jamieson und Palade, 1971; Palade, 1975). Die Biosynthese der sekretorischen Polypeptide erfolgt demnach an der cytoplasmatischen Seite des "rauhen" ER. Die Kette von

Aminosäuren wird während ihrer Synthese durch die Membran des ER in den Innenraum geschleust. Hier beginnen die Polypeptide ihre Tertiärstruktur auszubilden, Disulfidbrücken werden gebildet, Zuckerketten werden zum Teil noch während, zum Teil nach Beendigung der Synthese des Polypeptides angehängt. Die Polypeptide werden dann in Vesikeln zum Golgi-Komplex transportiert, wo weitere Modifikationen erfolgen können. Schließlich werden die Proteine in Granula verpackt, konzentriert und entweder in Vakuolen gespeichert oder durch den Vorgang der Exocytose aus der Zelle ausgeschleust (siehe Abbildung 1)

Ein weiterer Einblick in den Prozeß der Proteintranslokation war die Entdeckung, daß die meisten sekretorischen bzw. membrangebundenen Proteine als "Precursor-" (d.h. Vorläufer-) Moleküle synthetisiert werden (Milstein et al., 1972; Swan et al., 1972; I. Schechter, 1973; Kemper et al., 1974; Devillers-Thiery et al., 1975; vgl. Übersichtsartikel Rapoport und Wiedman 1985). Zusätzliche N-terminal gelegene hydrophobe Aminosäuresequenzen, sogenannte "Signalsequenzen" charakterisieren diese Proteine. Diese Entdeckung führte zu der "Signalhypothese" (Blobel und Sabatini, 1971; Blobel und Dobberstein, 1975 a,b) Gemäß dieser Hypothese erfolgt die Initiation der Proteinsynthese an freien Ribosomen im Cytoplasma. Die wachsende Polypeptidkette beginnt aus dem Ribosom herauszuragen, und die so exponierten Aminosäuren der "Signalsequenz" dirigieren das Ribosom an die Membran des ER. Eine Konsequenz dieses gerichteten Transportes ist die Ausbildung einer festeren Bindung zwischen dem Ribosom und Proteinen der ER-Membran. Es wurde postuliert, daß bei der Bildung des Ribosom-Membran-Komplexes oder während der Translation ein Tunnel innerhalb der ER-Membran gebildet wird, durch den die Polypeptidkette in das Innere des ER hineinwächst . Noch bevor die Translation beendet ist, wird die Signalsequenz durch spezifische Peptidasen abgespalten. Nach Beendigung der Proteinsynthese wird der Ribosom-Membran-Komplex aufgelöst, die Ribosomen dissoziieren ab und stehen für eine neue Runde der Proteinsynthese zur Verfügung.
Für dieses hier vorgestellte Modell, der sogenannten "vektoriellen Proteinsynthese, das die erste Phase einer Proteintranslokation beschreibt, sind also zwei Voraussetzungen unbedingt erforderlich: (1) Spezifische Rezeptormoleküle erkennen die "Information" der Signalsequenz, bewirken zunächst einen Translationsstop und führen schließlich zur Ausbildung des Ribosom-Membran-Komplexes, an der die Translation zu Ende geführt wird. (2) Eine Veränderung der ER-Membranstruktur gewährleistet den Durchtritt der wachsenden Polypeptidkette. Die Frage, wie ein Protein durch die ER-Membran geschleust wird, ist noch ungeklärt. Modelle, die diesen Vorgang zu beschreiben versuchen, sind in dem Übersichtsartikel von Dauffaud (Dauffaud et al., 1985) zusammengefaßt. So läßt sich zur Zeit nur die erste Voraussetzung sinnvoll diskutieren. Die Experimente und Erkenntnisse hierzu werden kurz beschrieben:

Milstein und Mitarbeitern in England gelang es 1972 die leichte Kette eines Immunoglobulins aus Mäusen, die mit Myelom-Tumoren infiziert waren, zu isolieren. In einem zellfreien Translationsexperiment wurde die mRNA in ein Proteinprodukt übersetzt, das ein etwas größeres Molekulargewicht hatte als das in vivo gebildete Molekül (Milstein et al., 1972). Genauere Untersuchungen ergaben, daß das im zellfreien

Extrakt gebildete Polypeptid ca. 20 zusätzliche Aminosäuren am Aminoende enthält, die im reifen Proteinmolekül fehlen (Burstein und Schechter 1978). Blobel und Dobberstein wiederholten 1975 das Experiment von Milstein. Sie fügten jedoch dem zellfreien Extrakt aus Kaninchen-Reticulozyten ER-Membranen aus Hundepankreas hinzu. In Abwesenheit der Membranen wurde das schon erwähnte Precursormolekül gebildet, während unter Zugabe von ER-Membranen das fertige Immunoglobulin synthetisiert wurde. Die Proteinprodukte unterschieden sich jedoch nicht nur in ihren Molekulargewichten, sondern auch hinsichtlich ihrer Lokalisation. Ihre experimentellen Daten zeigten, daß die in Gegenwart von ER-Membranen synthetisierten Proteine eingeschlossen in Membranvesikeln (Mikrosomen) vorlagen. Diese Translokation war jedoch nicht zu beobachten, wenn die Membranen nach Beendigung der Proteinsynthese hinzugefügt wurden. Die mit dem Transport einhergehende Abspaltung der Signalsequenz ist mit der Proteinsynthese gekoppelt; es handelt sich um einen cotranslationalen Prozeß.
Entscheidend für die Bestätigung der Signalhypothese war der Nachweis der postulierten Rezeptormoleküle, die zur Ausbildung des Ribosom-Membran-Komplexes führen. Das Signalsequenz-Erkennungsprotein "SRP" (signal recognition particle) ist ein 11 S Ribonucleoprotein bestehend aus sechs unterschiedlichen Polypeptidketten (Walter and Blobel, 1980) und einer 7 S RNA (Walter and Blobel, 1982). Das SRP verhindert die vollständige Translation sekretorischer Proteine in einem zellfreien System wenn Mikrosomen fehlen (Walter and Blobel, 1981 a,b; Walter et al., 1981). Nur in Gegenwart des membrangebundenen SRP-Rezeptormoleküls (Gilmore et al., 1982), auch "Docking"-Protein (Meyer et al., 1982) genannt, wird die durch SRP hervorgerufene Translationshemmung aufgehoben (Gilmore et al., 1982; Meyer et al., 1982).
Verschiedene Signalsequenzen prokaryotischer und eukaryotischer Proteine wurden bereits sequenziert. Die Signalsequenzen zeigen untereinander keine Sequenzhomologien und ihre Länge variiert zwischen 15 bis 35 Aminosäuren (Siehe Übersichtsartikel Rapoport und Wiedman 1985). Diese Variabilität findet man bereits bei Proteinen des gleichen Organismus. Perlman und Halvorson untersuchten die Signalsequenzen von 39 verschiedenen Proteinen bei Pro- und Eukaryonten (Perlman und Halvorson 1983). Alle Signalsequenzen beherbergen einen durchgehenden hydrophoben Aminosäurebereich, von mindestens 6 bis 7 Aminosäuren (As). Dieser Bereich ist bei prokaryotischen Proteinen bedeutend länger (14 bis 20 As); ferner zeigen diese Signalsequenzen am N-terminalen Bereich ein bis drei positiv geladene Aminosäuren. Bei eukaryotischen Proteinen ist diese Struktur nicht so stark ausgeprägt. Die Anzahl positiv geladener Aminosäuren variiert von 0 bis 2. Am carboxyterminalen Ende der Signalsequenzen (Spaltstelle) findet man bei prokaryotischen Proteinen die Aminosäuren Alanin oder Glycin, bei eukaryotischen Proteinen zu 40% polare oder geladene Aminosäuren.

Zusätzliche aminoterminale Sequenzen scheinen ebenfalls verantwortlich zu sein für die Translokation einer großen Anzahl von Proteinen in Mitochondrien und Chloroplasten (Dobberstein et al., 1977; Goldman und Blobel, 1978; Chua und Schmidt, 1979; Ellis, 1981; Poyton, 1983).
Mitochondrien und Chloroplasten zeichnen sich innerhalb der

Zelle durch eine eigene doppelsträngige zirkuläre DNA aus, die zur Replikation und Genexpression befähigt ist. Die Mehrzahl der Mitochondrien- bzw. Chloroplastenproteine werden jedoch von der DNA des Zellkerns kodiert und an freien Ribosomen im Cytoplasma übersetzt; der Transfer der neusynthetisierten Proteine erfolgt "posttranslational", d.h. unabhängig von der Proteinsynthese. Die Biosynthese des Chloroplastenenzyms "Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase (Chua und Schmidt, 1978; Berry-Lowe et al., 1982; Corruzzi et al., 1983, 1984; Dunsmuir und Bedbrook, 1983) und der Mitochondrienenzyme "F1-ATPase" (Maccecchini et al., 1979a) bzw. "Cytochrom-C-Oxidase" (Maccecchini et al., 1979b; Nagasawa et al., 1979; Poyton und McKemmie, 1979; Schmelzer und Heinrich, 1980) ist besonders in den letzten Jahren sehr intensiv erforscht worden. Es ergaben sich interessante Parallelen, die kurz beschrieben werden.
Alle drei genannten Enzyme sind Oligomere, die aus verschiedenen Polypeptiduntereinheiten zusammengesetzt sind. Einige Untereinheiten werden in der Matrix des entsprechenen Organells translatiert; eine zweite Klasse hingegen wird als "Precursor"-Moleküle an freien Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert. Die Vorläufermoleküle werden posttranslational zu ihrem Bestimmungsort innerhalb des Organells transferiert. Diese Translokation ist energieabhängig und erfolgt mit Hilfe von ATP. Es gibt gewichtige Hinweise dafür, daß bestimmte Rezeptormoleküle an der Außenmembran der Chloroplasten bzw. Mitochondrien die Information der Signalsequenz erkennen und am Vorgang der Translokation beteiligt sind (Neupert 1983, Riezman et al., 1983). Die Reifung der Untereinheiten durch spezifische Proteinasen sowie der Zusammenbau zum fertigen Holoenzym erfolgt innerhalb des Organells.

Eine wichtige Aufgabe der Signalsequenz der zuvor beschriebenen Proteine besteht in der Interaktion mit Rezeptormolekülen lokalisiert in der ER-Membran. Es stellt sich jedoch die Frage, ob diese Sequenzen für einen effektiven Sekretionsprozeß allein ausreichen. Möglicherweise liegen noch zusätzliche Informationsstrukturen innerhalb eines Proteins vor. Diese Signale könnten für einen gezielten Transport der Proteine vom ER zum Golgi-Komplex und für den Transfer zu Zellkompartimenten wie Lysosom, Vakuole, Zellwand oder Außenmedium entscheidend sein. Diese sogenannten "sorting"- Signale können sowohl co- als auch posttranslational zugefügt werden; die Art der Modifikation ist jedoch bereits in der Aminosäuresequenz festgelegt. So ist bekannt, daß nur solche Proteine im ER mit einer Kohlenhydratgruppe versehen werden, die eine Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr Aminosäuresequenz aufweisen ("X" bedeutet eine beliebige Aminosäure). Dieser Zuckeranteil, bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose- und drei Glucosemolekülen, wird als Core-Glykosylierung bezeichnet. In den letzten Jahren hat man intensiv nach Sorting-Signalen geforscht. Die zunächst gesetzte Hoffnung allgemein gültige Mechanismen aufzudecken, wurde nicht erfüllt. Dennoch lassen sich zwei Beispiele anführen, die die Existenz postulierter Signalstrukturen aufzeigen. Hierzu gehört die Biosynthese der membrangebundenen Glykoproteine sowie der in Lysosomen befindlichen Hydrolasen.
Wie die sekretorischen Proteine, so werden auch die Glykoproteine der Plasmamembranen an gebundenen Polysomen des "rauhen" ER synthetisiert und cotranslational als "Precursor"-Moleküle

in das ER-Lumen geschleust (Rothman and Lodish, 1977; Garoff et al., 1978; Lingappa et al., 1978; Dobberstein et al., 1979; Krangel et al., 1979). Die Core-Glykosylierung erfolgt ebenfalls cotranslational im ER, die Modifikation zum fertigen Glykoprotein hingegen posttranslational im ER und Golgi-Komplex (Hunt et al., 1978; Leblond und Bennett, 1977; Lennarz, 1980; Parodi und Leloir, 1979; Robbins et al., 1977; Schachter und Roseman, 1980; Tabas et al., 1978; Hubbard und Ivatt, 1981). Der wichtige Unterschied zu sekretorischen Proteinen besteht in einer zusätzlichen hydrophoben Sequenz, die das Protein in der Membran verankert. Diese "Halt"-Sequenzen sind typische Elemente von Membranproteinen, und man kann sie als sekundäre Zielsignale ansehen. Im Gegensatz zu den lysosomalen Proteinen (s.u.) scheinen die Kohlenhydratketten der Glykoproteine kein Bestandteil eines sorting-Signals zu sein. Experimentelle Daten zeigen, daß die meisten Proteine in Gegenwart von Tunicamycin, einem Inhibitor der Glykosylierung, ihren Bestimmungsort erreichen können (Gibson et al., 1978; Roth et al., 1979; Strous und Lodish, 1980; Green et al., 1981). Dennoch gibt es einige Fälle, die darauf hinweisen, daß die Glykosylierung sekretorischer Proteine für den Ausschleusungsvorgang von Bedeutung ist (Machamer et al., 1985, Guan et al., 1985).
Bei den lysosomalen Proteinen hingegen ist die Glykosylierung entscheidend für die Translokation. Auch diese Enzyme werden mit Hilfe einer Signalsequenz durch die ER-Membran transportiert (Erickson und Blobel, 1979; Hasilik und Neufeld, 1980 a; Rosenfeld et al., 1982) und core-glykosiliert. Bereits im ER-Lumen wird die Glucosegruppe durch spezifische Glucosidasen modifiziert. Eine weitere Modifikation der Kohlenhydratketten erfolgt offensichtlich im Golgi-Komplex. Durch eine N-Acetylglucosaminyltransferase werden N-Acetylglucosamin 1-Phosphatmoleküle an einige Mannosereste gebunden, und durch eine Phosphodiesterase ohne den Phosphatanteil wieder abgespalten (Tabas und Kornfeld, 1980; Hasilik und Neufeld, 1980 b). Beide Enzyme befinden sich im Golgi-Komplex (Varki und Kornfeld, 1980; Reitman und Kornfeld, 1981). Die exponierten Phosphatgruppen werden von Rezeptormolekülen im Golgi-Komplex erkannt, und es erfolgt ein Transport mit Hilfe von Vesikeln zu den Lysosomen. Brown und Farquhar (1984) konnten diese Rezeptoren durch Antikörper und Immunelektronenmikroskopie in den Zisternen des Golgi-Komplexes und in den Transportvesikeln nachweisen.

Einige sekretorische Proteine weisen neben der Signalsequenz noch eine zusätzliche Sequenz auf, die das reife prozessierte Protein nicht mehr besitzt. Häufig werden diese Sequenzen als Prosequenzen bezeichnet. Ihre Bedeutung ist noch unbekannt. Als Beispiele können angeführt werden die Prosequenz des Alpha-Faktors bei S.cerevisiae (Julius et al., 1983, 1984 a,b), des Mellitins bei Bienen (Kreil et al., 1980 a,b), des Insulins (Steiner et al., 1980) und des Chymosins (Moir et al., 1985). Beim Killer-Toxin der Hefe findet man neben der Signalsequenz ebenfalls eine zusätzliche Aminosäuresequenz, die das reife aktive Protein nicht aufweist. Auch hier spricht man von einer Preprotoxin-Struktur des Vorläufermoleküls (Boone et al., 1986)
Die Mehrzahl der sekretorischen Proteine sind jedoch nur durch eine Signalsequenz gekennzeichnet.

Um die molekularbiologischen Mechanismen der Proteintranslokation zu untersuchen, haben sich drei experimentelle Verfahrensweisen bewährt:

1) Das "in vitro" Translations- Translokationssystem

Die Entwicklung eines in vitro Translationssystems, das Studien von Translokationsereignissen an Membranen ermöglichte (Blobel und Dobberstein, 1975 a,b), war besonders bedeutungsvoll zur Beweisführung der Signalhypothese. Dieses System hat entscheidend dazu beigetragen, elementare Vorgänge an ER-Membranen näher zu untersuchen. Unter anderem konnte hierdurch gezeigt werden, daß die Abspaltung der Signalsequenz und die Core-Glykosylierung cotranslational erfolgt (Rothman und Lodish, 1977). In vitro Translationssysteme wurden ebenfalls angewendet um den posttranslationalen Transfer von Proteinen in Chloroplasten (Dobberstein et al., 1977; Chua und Schmidt, 1979), Mitochondrien (Chua und Schmidt, 1979; Poyton, 1983) und Peroxisomen (Goldman und Blobel, 1978) zu studieren.
Erst kürzlich konnte auch aus S.cerevisiae ein zellfreies Membransystem entwickelt werden, das zur Translokation und Glykosylierung von Proteinen befähigt ist (Rothblatt und Meyer, 1986).

2) Die Untersuchung von sekretionsdefekten Mutanten

Schekman und Mitarbeitern ist es gelungen Mutanten von S.cerevisiae zu isolieren, die temperatursensitive Defekte in ihrem Sekretionsweg aufweisen. Bei einer Temperatur von 37 ^{o}C zeigen die sekretionsdefekten Mutanten eine höhere Dichte als normale Hefezellen. Über zweihundert verschiedene Hefemutanten wurden isoliert , die bei restriktiver Temperatur weder Sekretion noch Zellwachstum zeigten. Diese Mutanten ließen sich, bezogen auf die Proteinsynthese, in zwei Gruppen einteilen (Novick et al., 1980; Ferro-Novick et al., 1984 a,b). Die erste Gruppe synthetisiert und akkumuliert aktive sekretorische Enzyme bei 37 ^{o}C. Die Anhäufung sekretorischer Proteine wie Invertase und saure Phosphatase erfolgt in speziellen Organellen, die normalerweise in einer Hefezelle nicht nachweisbar sind. Die zweite Gruppe der sekretionsdefekten Mutanten produziert inaktive Invertase- bzw. Phosphatasemoleküle. Bei den Mutanten der ersten Gruppe sind offensichtlich Sekretionsschritte, die nach dem Einschleusen der sekretorischen Proteine ins ER folgen, blockiert; während bei der zweiten Gruppe bereits der Translokationsvorgang an den ER-Membranen defekt ist.

3) Die Untersuchung der Lokalisation von Hybridproteinen

In den letzten Jahren hat man zunehmend die Lokalisation von Hybridproteinen studiert, die von fusionierten Genen kodiert werden. (vgl. Übersichtsartikel Garoff 1985). Mit Hilfe der Gentechnologie lassen sich DNA-Fragmente unterschiedlicher Gene kombinieren. Die Methode ermöglicht es, die Funktionen bestimmter Aminosäuresequenzen von Proteinen, zu untersuchen. Durch gezielte Genfusionen lassen sich Proteine in Membranproteine (Moreno et al., 1980; Yost et al., 1983; Rasmussen et

al., 1984), mitochondriale Proteine (Hurt et al., 1984, 1985; Horwich et al., 1985), Chloroplasten- (Winter, 1986) oder Kernproteine (Silver et al., 1984) umwandeln.

Auch in der vorliegenden Promotionsarbeit wird mit Hilfe von Genfusionen die Lokalisation eines prokaryotischen Proteins, der ß-Lactamase, in der Bäckerhefe S.cerevisiae untersucht. Das Hauptinteresse lag in der Erforschung von Aminosäuresequenzen, die zum Ausschleusen der ß-Lactamase aus der Hefezelle führen.

Aufgrund der Entwicklung eines wirksamen Transformationssystems für die Hefe S.cerevisiae (Hinnen et al., 1978; Beggs, 1978; Hicks et al., 1979; Struhl et al., 1979) lassen sich Expressionsstudien artfremder Gene in der Hefe durchführen. Ein besonderes Interesse, sowohl im Hinblick der Grundlagenforschung als auch der angewandten Gentechnologie, ist die Untersuchung der Expression prokaryotischer Gene in einem eukaryotischen Organismus, wie z.B. der Hefe. So konnte bereits 1979 gezeigt werden, daß prokaryotische Resistenzgene in transformierten Hefezellen zu aktiven Proteinen übersetzt werden (Hollenberg 1979 a,b). Ein interessantes Untersuchungsobjekt ist der Resistenzfaktor gegen Penicillin, die ß-Lactamase. Dieses Protein läßt sich sowohl enzymatisch als auch immunologisch leicht nachweisen und eignet sich deshalb besonders gut zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen der Genexpression.

Die ß-Lactamase wird in E.coli als Precursormolekül exprimiert, das gekennzeichnet ist durch eine Signalsequenz von 23 Aminosäuren (Sutcliffe, 1978; Ambler und Scott, 1978). Während der Sekretion in den periplasmatischen Raum der E.coli Zelle wird die Signalsequenz abgespalten (Koshland et al., 1980). Das aktive Enzym spaltet den Lactamring des Antibiotikums Penicillin (Benveniste und Davies, 1973) oder entsprechende Substanzen, die ebenfalls in ihrer chemischen Struktur einen Lactamring aufweisen, wie zum Beispiel das Cephalosporinderivat Nitrocefin (O'Callaghan et al., 1972).

Erste enzymatische Studien transformierter Hefezellen zeigten, daß auch in Hefe das prokaryotische Gen in ein aktives Enzym übersetzt wird (Hollenberg 1979 a,b). Das Molekulargewicht des Proteins entspricht dem der reifen ß-Lactamase in E.coli (Roggenkamp et al., 1983). Die Genexpression konnte durch den Austausch des prokaryotischen Promotors gegen den Hefepromotor des ADH1-Gens wesentlich gesteigert werden (Reipen et al., 1982). Durch Ansequenzierung des in Hefe exprimierten aktiven Enzyms vom N-terminalen Ende konnte nachgewiesen werden, daß an der gleichen Spaltstelle wie in E.coli die Signalsequenz geschnitten wird (Roggenkamp et al., 1983). Im Gegensatz zu E.coli zeigte die Genexpression in Hefe zwei wesentliche Unterschiede: (1) Die Spaltung des Vorläufermoleküls zur reifen ß-Lactamase erfolgt sehr ineffizient. Nur etwa 10% des synthetisierten Proteins werden in die aktive Proteinform umgewandelt. (2) Eine Translokation der ß-Lactamase durch die Plasmamembran, die Voraussetzung für die Lokalisierung in der Zellwand oder zur Sekretion ins Medium ist, konnte bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden. Kulturmedien transformierter Hefezellen zeigten nur schwache ß-Lactamaseaktivitäten; etwa

UNIV. LEIDEN BIBL.

10% der Enzymaktivität in Rohextrakten transformierter Hefezellen konnten im Medium nachgewiesen werden (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf). Immunologische Untersuchungen des Kulturmediums von Hefetransformanten, die das Plasmid pADH040-2 enthielten, zeigten auch unprozessierte Vorläufermoleküle (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf); ein Hinweis, daß ein Teil der ß-Lactamase aufgrund lysierter Zellen ins Medium gelangt.

Die prokaryotische Signalsequenz der ß-Lactamase ist demnach nicht ausreichend für einen wirkungsvollen Export des Proteins aus transformierten Hefezellen. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da in anderen eukaryotischen Zellen bereits gezeigt werden konnte, daß prokaryotische Signalsequenzen in Eukaryonten zur Proteinsekretion führen. Dies wurde für die Endo-ß-1,3-1,4-glucanase von Bacillus subtilis in Hefe (Nicaud et al., 1985) und für die ß-Lactamase in Xenopus Oozyten (Wiedmann et al., 1984) nachgewiesen werden. Umgekehrt führen eukaryotische Signalsequenzen in einer prokaryotischen Zelle ebenfalls zum Export des entsprechenden Proteins (siehe Übersichtsartikel Nicaud et al., 1986; Roggenkamp et al., 1986).

Die Prozessierung der ß-Lactamase führte zur Annahme, daß das reife Protein im ER vorlag. Dies konnte mit Hilfe einer ß-Lactamaseinvertasefusion nachgewiesen werden (Hollenberg et al. 1986). Für die nicht stattfindende Sekretion gab es zwei Erklärungsmöglichkeiten: (1) Die ß-Lactamase besitzt eine Proteinstruktur, die es nicht erlaubt, daß das Protein durch den Sekretionsweg der Hefezelle geschleust werden kann, oder aber (2) das Molekül benötigt zusätzliche Translokationssignale, die auf dem bakteriellen Protein nicht vorhanden sind. Zur Klärung dieser Frage wurde als experimenteller Ansatz das ß-Lactamasegen mit zwei unterschiedlichen Hefegenen fusioniert, die sekretorische Proteine kodieren. Die Experimente sollten Aufschluß darüber geben, ob durch gezielte Genfusionen die ß-Lactamase in ein sekretorisches Hefeprotein verändert werden kann und welche Gensequenzen hierfür entscheidend sind.

Obwohl die Hefezelle im eigentlichen Sinne nicht als eine typische sekretorische Zelle angesehen werden kann, ist doch in den letzten Jahren, im Hinblick auf Sekretionspozesse, intensive Forschung an diesem einfach strukturierten eukaryotischen Organismus betrieben worden (vgl. Übersichtsartikel Schekman und Novick 1982). Im Gegensatz zu tierischen und pflanzlichen Drüsenzellen besitzt die Hefe kein ausgeprägtes rauhes ER, und Zellstrukturen, die einem Golgi-Komplex entsprechen, konnten bislang elektronenmikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Nur wenige sekretorische Proteine sind zur Zeit in der Hefe näher untersucht worden. Eine Übersicht gibt Tabelle I.

Die zwei Hefegene, die für die Promotionsarbeit zur Verfügung standen, waren das SUC2-Gen der Invertase und die DNA-Sequenz, kodierend für das Preprosignal des Alpha-Faktors.

Der Alpha-Faktor, ein Sexpheromon bestehend aus 13 Aminosäuren, wird von Hefezellen des Alpha-Paarungstyps als Precursor-

molekül, das vier Kopien des Hormons enthält, synthetisiert (Betz et al., 1981; Brake et al., 1983; Julius et al., 1983; Julius et al., 1984a,b). Eine Preprosequenz, bestehend aus 89 Aminosäuren, die das Precursormolekül kennzeichnet, wird innerhalb der Hefezelle durch eine spezifische Lysin-Arginin spaltende Endopeptidase gespalten (Julius et al., 1983; 1984a,b). Die vier Kopien des Pheromons werden während der Reifung durch eine zweite Endopeptidase in die aktiven Proteine umgewandelt, die ins Medium ausgeschleust werden (Julius et al., 1983; Achstetter und Wolf, 1985). Durch Fusion der Preprosequenz des Alpha-Faktors mit anderen eukaryotischen Proteinen konnte die Sekretion dieser Fusionsprodukte in Hefe nachgewiesen werden (Emr et al., 1983; Brake et al., 1984; Bitter et al., 1984).

Tabelle I: Sekretorische Proteine der Hefe

	Struktur-gene	Regulation durch	Glykosy-lierung	Lokalisa-tion
Invertase	SUC1-SUC6	Glucose	+	Zellwand
Saure Phosphatase	PHO5	Phosphat	+	Zellwand
Saure Phosphatase	PHO3	konstitutiv	?	Zellwand
α-Galactosidase	MEL1	Galactose	+	Zellwand und Medium
L-Asparaginase	ASP3	Stickstoff	+	Zellwand
Exo-1,3-ß-glucanase	EXB1	konstitutiv ?	?	Zellwand
Endo-1,3-ß-glucanase	?	konstitutiv ?	+	Zellwand und Medium
Pheromon-peptidase	?	?	?	Medium
α,a Faktor	MFα1, MFa1 u. MFa2[a]	MAT Locus	-	Medium
Killer Toxin	M1-1[b]	KEX Gene	-	Medium

übernommen und aktualisiert nach Schekman und Novik 1982
a) Brake et al., 1985; b) Skipper et al., 1984

Sekretionsstudien in Hefe wurden auch mit Hilfe des klonierten SUC2-Gens der Invertase durchgeführt (Emr et al., 1984; Smith et al., 1985; Chang et al., 1986). Das SUC2-Gen der Hefe S.cerevisiae kodiert zwei Formen der Invertase: eine sekretorische, glykosylierte Form, deren Synthese Glucose reprimiert ist, und eine konstitutive, intrazelluläre Form, die nicht glykosyliert ist (Gascon et al., 1968; Hackel, 1975; Grossmann und Zimmermann, 1979). Die beiden Proteinformen unterscheiden sich nur durch die vorgeschaltene Signalsequenz und durch die Glykosylierung. Die Translokation der sekretorischen Invertase durch den Sekretionsweg der Hefe (ER, Golgi-Komplex und sekretorische Vesikel) zur Hefezellwand, konnte klar gezeigt werden (Scheckman und Novick, 1982). Das Enzym wird beim Eintritt ins

ER-Lumen core-glycosyliert (Trimble und Maley, 1977). Im Golgi-Komplex erfolgt Prozessing und Modifikation der Core-Oligosaccharide; Kohlenhydratketten, bestehend aus Mannose, bilden nun die äußeren Zuckerreste (Esmon et al., 1981). Die glykosylierte Invertase wird in sekretorische Vesikel verpackt und zur Zellwand transportiert (Novick et al., 1980).
Auch hier bestand Interesse nachzuprüfen, ob durch Genfusionen der Invertase mit der ß-Lactamase die synthetisierten Hybridproteine durch den Sekretionsweg der Hefe geschleust werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Stämme und Medien

2.1.1. Hefestämme

S.cerevisiae AH22	(leu2-3, leu2-112, his4-519, can1), konstruiert von Hinnen et al. (1978)
S.cerevisiae GRF18 (=LL20)	(leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15) isogen mit AH22, konstruiert von G.R. Fink
S.cerevisiae EK1	(leu2-3, leu2-112, pep4-3), konstruiert von E. Kellermann (1986)
S.cerevisiae Stamm 78	(kex2-1, his7), konstruiert von Leibowitz und Wickner (1976)

Die Hefezellen werden bei 30 °C angezogen.

2.1.2. Anzuchtmedien für Hefe

Vollmedium (YEPD-Medium): 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Pepton, 2% (w/v) Glucose

Vollmedium ohne Glucose (YEP-Medium): 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Pepton

Minimalmedium (YNB-Medium): 0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, 2% (w/v) Glucose, 3,13 ml 50%ige Na-Lactatlösung
H_2O ad 1 Liter
Notwendige Aminosäuren werden in der Endkonzentration von 20 µg/ml zugefügt.

2.1.3. Bakterienstämme

E.coli JA221	recA1, leuB6, trpE5, $hsdR^-$, $hsdM^+$, lacY, C600, konstruiert von J. Carbon
E.coli JA300	thr^-, leuB6, thi^-, thyA, trpC1117, hsr_k, hsm_k, str^r von Tschumper und Carbon (1980).

Die Anzucht der *E.coli* Stämme erfolgt bei 37 °C.

2.1.4. Anzuchtmedien für Bakterienstämme

Vollmedium (L-Broth): 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) Glucose

Minimalmedium (M9-Medium): Zur Herstellung des Minimalmediums werden die sterilisierten Stammlösungen wie folgt zusammengegeben:

100 ml Glucose-Lösung (20 g Glucose H_2O dest. ad 500 ml)
10 ml $MgSO_4$-Lösung (2,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ / 100 ml H_2O dest.)
10 ml $CaCl_2$-Lösung (0,2 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ / 100 ml H_2O dest.)
100 ml M9-Salz-Lösung (35 g Na_2HPO_4, 15 g KH_2PO_4, 2,5 g NaCl und 5 g NH_4Cl / 500 ml H_2O dest.)
780 ml Aq.dest. oder 1,8%iger Agar für feste Nährböden.

Notwendige Aminosäuren werden in den Endkonzentrationen von 20 µg/ml hinzugefügt. Ebenfalls, wenn notwendig, Thiamin und Thymin in den Endkonzentrationen von 2 und 50 µg/ml.

2.2. Verwendete Plasmide

pBR322 (Bolivar et al., 1977), pBR325 (Bolivar 1978), pJDB219 (Beggs et al., 1978), pRB58 (Carlson und Botstein 1982), pJDY15 (Scott D. Emr, Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, California 94720), pTG2 (Kadonaga et al., 1984)

Für diese Dissertation wurden folgende Plasmide konstruiert:
pGR1 (A) und (B), pGRT1-22, pGRT1-9, pGRT1-913, pGRT2-6310, pINV325-4, pINV325-7, pINV325-57, pHVOS, pHVOS1 bis pHVOS26

2.3. DNA-Präparationen

2.3.1. Plasmid-DNA-Isolierung aus E.coli (Clewell und Helinski 1969)

100 ml Hauptkultur wird mit 50 µl E.coli Vorkultur angeimft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtkultur wird einmal in 10 ml Tris/Saccharoselösung (25%ige Saccharose in Tris-HCl, pH 8,0) gewaschen und in 7,5 ml Tris/Saccharoselösung aufgenommen. 1,5 ml Lysozymlösung (5 mg/ml in Tris/Saccharose) und 0,5 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0) werden zur Protoplastierung hinzugefügt. Die Zellsuspension wird 10 min bei Zimmertemperatur und anschließend 15 min in Eis inkubiert. Die Lysis der Zellen erfolgt durch Zugabe von 4,5 ml 3-fach konz. Triton-Mix (3 ml 10% (v/v) Triton X-100, 75 ml 0,25 M EDTA, 7 ml Aq.dest., 15 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0). Zellreste und der größte Teil der chromosomalen DNA werden durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 25000 x g abgetrennt. Der Überstand wird mit 15 ml H_2O verdünnt. Nach anschließender Phenolextraktion wird die wässrige Phase mit 1/100 Volumen 5 M NaCl und 2 Volumen 96%igem Ethanol versetzt und die DNA bei -20 °C für 2 Stunden gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 6 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gelöst. Es wird 400 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) und 6,8 g $CsCl_2$ zugefügt. Die Gleichgewichtszentrifugation erfolgt im Beckman Vertikalrotor VTi65 bei 44000 UpM für mindestens 15 Stunden. Die Plasmidbande wird mit einer Spritze aus dem Gradienten isoliert, das Ethidiumbromid durch mehrmaliges Ausschütteln mit 1 Volumen Isoamylalkohol entfernt, und die Probe mit 2 Volumen kaltem H_2O dest. verdünnt. Die DNA wird durch Zugabe von 2 Volumen 96%igem Alkohol ge-

fällt und das getrocknete Pellet in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. Die DNA-Lösungen werden bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2. Plasmid-DNA-Isolierung aus E.coli Minilysaten (nach Birnboim und Doly 1979, modifiziert von D.Ish-Horowitz, in Maniatis et al. 1982)

1,5 ml einer E.coli Übernachtkultur wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert, die Zellen in 100 µl Glucoselösung (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) aufgenommen, und die Probe für 5 min in Eis inkubiert. Anschließend werden 200 µl NaOH-Lösung (0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS, stets frisch angesetzt) hinzugegeben, das Eppendorfgefäß kurz geschüttelt, und die Zellen für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zellaufschluß werden 150 µl Acetat-Mix (60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml H_2O) hinzugegeben und die Suspension für 10 Sekunden auf dem Vortex-Rührer kräftig geschüttelt. Die lysierten Zellen werden für 10 min bei 10000 UpM in einer Eppendorftischzentrifuge bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein zweites Eppendorfgefäß überführt und mit Phenol extrahiert (Siehe unter 2.4.). Die Fällung der DNA erfolgt bei -70 °C für 30 min. Die DNA wird 10 min bei 10000 UpM abzentrifugiert, das Pellet mit 70%igem kaltem Ethanol nachgewaschen und getrocknet. Die DNA wird in 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. 15 µl dieser Lösung enthalten im Durchschnitt 1 µg DNA.

2.4. DNA-Aufreinigung durch Phenol-Extraktion

Die aufzuarbeitende DNA-Probe wird mit 1 Volumen 10 mM Tris/HCl-gesättigtem Phenol pH 7,5 versetzt, gut gemischt und zur Phasentrennung bei 10000 x g für 5 min abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgehoben, mit Chloroform-Isoamylalkohol (25:1) nachgewaschen und anschließend mit 2 Volumen 96%igem Ethanol versetzt. Die DNA-Probe wird bei -20 °C gefällt, mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, das DNA-Pellet getrocknet, und die Probe in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gelöst.

2.5. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Verdauungen erfolgen nach den für das jeweilige Enzym vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Als Abweichung davon beträgt das Reaktionsvolumen pro Mikrogramm DNA 20 µl, und die Inkubationszeit zwei Stunden.

2.6. DNA-Doppelstrangabbau mit Hilfe der Exonuklease Bal 31

Für die Bal31-Verdauung werden 20 µg über $CsCl_2$-Gradient gereinigte DNA eingesetzt, die mit dem entsprechenden Restriktionsenzym zuvor linearisiert wurde. Die Inkubation der DNA erfolgt bei 30 °C mit 10 U Bal31-Enzym im Inkubationspuffer, bestehend aus 200 mM NaCl, 12 mM $CaCl_2$, 12 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7,2.

Die Enzymreaktion wird abgestoppt durch Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und 10 mM EDTA.

2.7. DNA-Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase

Die Auffüllreaktion der 5'DNA-Enden erfolgt im Klenow-Polymerasepuffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM ß-Mercaptoethanol, 50 µg/ml BSA, pH 7,8) unter Zugabe von 1 U Klenow-Polymerase bezogen auf 5 µg DNA. Die Inkubationszeit beträgt 30 min bei Zimmertemperatur. Die Enzymreaktion wird durch zehnminütiges Erhitzen auf 65 °C abgestoppt.

2.8. DNA-Ligation

1 µg DNA wird in 20 µl Gesamtvolumen mit 0,1 Enzymeinheiten T4-Ligase (Boehringer, Mannheim) über Nacht bei 15 °C oder für 4 Stunden bei Zimmertemperatur ligiert. Bei "Blunt-End"-Ligationen wird 1 U T4-Ligase pro Mikrogramm DNA eingesetzt. Der Ligationspuffer enthält: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 2 mM ATP, pH 7,6.
Für die E.coli Transformation wird 1/2 Volumen des Ligationsansatzes ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

2.9. Gelelektrophorese

Die DNA-Proben werden zur Kontrolle der Restriktionsverdauung, der Ligation und der Restriktionskartierung auf einem 0,7%igem Agarose-Flachgel aufgetrennt. Eingesetzt werden jeweils 0,5 bis 1 µg DNA-Probe plus 2 µl Bromphenolblaulösung (0,2%ig in 60% (w/v) Sucrose in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) als Markierung der Lauffront. Die Elektrophorese wird für 4 Stunden bei 100 V oder über Nacht bei 35 V bei Raumtemperatur durchgeführt.

Als Laufpuffer wird TBE-Puffer (54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 5 mM EDTA ad 1 l Aq.dest., der pH-Wert wird mit HCl auf pH 8,0 eingestellt) verwendet. Auf 1 l TBE-Puffer werden 200 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt.

2.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (modifiziert nach Dretzen et al., 1981)

Die zuvor mit Restriktionsenzymen verdauten DNA-Proben werden auf einem Agarosegel (siehe 2.9.) aufgetrennt. Mit Hilfe eines Transilluminators werden die DNA-Banden sichtbar gemacht und mit einer Rasierklinge aus dem Agarosegel isoliert. Die DNA-Fragmente werden auf DEAE-81 Zellulosepapier (Schleicher und Schüll, D-3354 Dassel) überführt, das vorher in 2,5 M NaCl gelegt und dann mehrmals mit Aq.dest. gewaschen wurde. Die isolierten Agaroseblöckchen mit dem entsprechenden DNA-Fragment werden für den Transfer in ein neues Agarosegel so eingegossen, daß das DEAE-Papier ohne Zwischenraum angrenzt. Der Transfer erfolgt bei 90 V für mindestens eine halbe Stunde. Mit Hilfe einer Hand-UV-Lampe kann dieser Vorgang kontrolliert werden.
Nach dem Transfer wird das DEAE-Papier in sterilem Aq.dest.

gewaschen und in kleine Stücke zerrupft. Das Papier wird in Elutionspuffer (2 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) gegeben und 4 Stunden bei 37 °C kräftig geschüttelt.
Zur Isolation der DNA-haltigen Probe wird das Eppendorfgefäß mit einer heißen Nadel am Boden durchstoßen und in die obere Öffnung einer 5 ml Gilson-Pipettenspitze gesteckt, in deren Spitze sich Glaswolle befindet. Die Pipettenspitze wird in ein zweites Eppendorfgefäß gestellt und die gesamte Konstruktion in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Durch anschließende Zentrifugation bei 4000 UpM in einer Tischzentrifuge gelangt die DNA-haltige Probe in das untere Eppendorfgefäß, wobei Papier- und Agarosereste durch die Glaswolle zurückgehalten werden.
Die DNA wird mit 1/2 Volumen Isopropanol über Nacht bei -20 °C gefällt, bei 10000 UpM in einer Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert, getrocknet und anschließend in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. Zur Aufreinigung der DNA erfolgt eine Phenolextraktion (2.4.). Die DNA-Probe wird schließlich in 10 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen.

2.11. Isolation von DNA-Fragmenten aus "Low-melting Agarose"

Zur Auftrennung von 300 bis 700 Bp großen DNA-Fragmenten wird ein 1%iges (w/v) Low-melting-Agarosegel angefertigt. Die Auftrennung erfolgt analog 2.9.
Nach der Auftrennung werden die zu isolierenden DNA-Banden mit Hilfe einer UV-Lampe sichtbar gemacht und mit einer Rasierklinge aus dem Gel herausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Agaroseblöckchen werden je nach Größe in 50 bis 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen und mit 1 Volumen Phenol (gesättigt mit 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5) und 2 µl tRNA (10 mg/ml) versetzt. Die Proben werden für 15 min auf 56 °C erhitzt und anschließend für 1 min auf einem Vortex-Mixer krätig geschüttelt, danach abzentrifugiert, und die wässrige Phase abpipettiert. Die Phenolphase wird ein zweitesmal mit 1/2 Volumen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 nachgewaschen. Beide wässrige Phasen werden vereinigt, mit 1 Volumen Phenol/Chloroformgemisch versetzt und für 30 sec. krätig vermischt. Die Proben werden abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und mit Chloroform/Isoamylalkohol nachbehandelt (siehe unter 2.4.) und die DNA-Fragmente mit Ethanol gefällt.

2.12. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) in Anlehnung an das Protokoll in Maniatis et al., 1982.

E.coli Minilysat-DNA, gewonnen aus einer 10 ml Kultur, wird mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut. Die DNA-Probe wird durch eine Phenolextraktion aufgereinigt und mit 96%igem Ethanol gefällt.
Für die radioaktive 3'Endmarkierung wird die DNA-Probe (ca 30 µg) in 40 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. Der DNA-Probe werden 5 µl 10-fach konz. HSB-Puffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 1000 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7,5), 40 µCi α-^{32}P-dGTP und 0,2 U Klenow-Fragment (Boehringer) hinzugegeben. Die 3'Endmarkierung erfolgt bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden.

Die Nukleotide werden anschließend durch Gelfiltration über eine Sephadex G100 Säule (Säulenhöhe ca. 10 cm) getrennt. Als Elutionspuffer dient TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 7,5). Das Eluat wird in Fraktionen zu je 4 Tropfen (ca. 100 µl) gesammelt. Die Fraktionen mit der radioaktiv markierten DNA werden vereinigt, und die DNA über Nacht gefällt. Die markierte DNA wird mit dem Restriktionsenzym PstI nachgeschnitten und über ein 0,7%iges Low-Melting-Agarosegel aufgetrennt. Die zu sequenzierenden Fragmente (245 Bp und 480 Bp) werden aus der Agarose isoliert (siehe unter 2.11.).

DNA-Spaltungsreaktion:

1) G: 5 µl DNA-Probe + 200 µl DMS-Puffer (50 mM Natriumkakodylat, 1 mM EDTA, pH 8,0) + 2 µl DMS, 135 sec. bei Raumtemperatur + 50 µl DMS-Stop (1,5 M Natriumacetat, 1,0 M ß-Mercaptoethanol, 100 µg/ml t-RNA, pH 7,0).

2) G+A: 10 µl DNA-Probe + 25 µl H_2O + 50 µl 96%ige Ameisensäure, 5 min bei Raumtemperatur + 165 µl HZ-Stop (0,3 M Natriumacetat, 0,1 mM EDTA, 25 µg/ml t-RNA).

3) T+C: 20 µl DNA-Probe + 30 µl 95%iges Hydrazin, 5 min bei Raumtemperatur + 200 µl HZ-Stop.

4) C: 5 µl DNA-Probe + 15 µl 5 M NaCl + 30 µl 95%iges Hydrazin, 5 min bei Raumtemperatur + 200 µl HZ-Stop.

Die DNA-Proben werden durch Zugabe von 750 µl 96%iges Ethanol bei 0 °C (G+A Probe bei -70 °C) für 15 min gefällt. Die gefällten DNA-Proben werden in einer Eppendorfzentrifuge für 10 min abzentrifugiert, in 200 µl Aq.dest. gelöst und durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetatlösung und 750 µl Ethanol bei -70 °C für 15 min ein zweitesmal gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation werden die DNA-Pellets zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die getrockneten DNA-Proben werden anschließend in 50 µl Aq.dest. gelöst und nach Zugabe von 50 µl 2 M Piperidin für 30 min bei 90 °C inkubiert. In einer Speedvac-Zentrifuge werden die Proben über Nacht lyophylisiert und anschließend in 5 bis 10 µl Probenpuffer (80% (v/v) deionisiertes Formamid, 50 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA, 0,1% (w/v) Xylencyanol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 8,3) aufgenommen.

Die DNA-Proben werden auf einem 18%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, das wie folgt hergestellt wird:

90 ml 20%ige Acrylamid-Stammlösung, 10 ml Harnstoff-Mix, 70 µl TEMED und 500 µl 10%ige (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung. Die Gele werden mit einer Stärke von 0,3 mm zwischen zwei Glasplatten, von denen eine silikonisiert ist, gegossen. Als Elektrophoresepuffer wird TBE-Puffer verwendet. Die Auftrennung erfolgt bei konstanter Leistung von 50 bis 60 W.

20%ige Acrylamid-Stammlösung: 96,5 g Acrylamid, 3,35 g N',N'-Methylen-Bisacrylamid, 233,5 g Harnstoff, 100 ml 5-fach konz. TBE-Puffer (54 g Tris-HCl, 27,5 g Borsäure, 0,5 M EDTA, pH 8,0), Aq.dest ad 500 ml.

Harnstoff-Mix: 233,5 g Harnstoff, 100 ml 5-fach konz. TBE-Puffer, Aq.dest. ad 500 ml

2.13. E.coli Transformation (Mandel und Higa 1970)

20 ml einer E.coli Kultur werden auf L-Broth bis zu einer Dichte von A_{600} = 0,5 angezogen. Die Kultur wird abzentrifugiert, in 0,5 ml 0,1 M $MgCl_2$ aufgenommen und für 20 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden anschließend abzentrifugiert und in 1 ml 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert. Zu 0,1 ml der kompetenten Zellen werden etwa 0,1 bis 0,5 µg DNA gegeben und die Probe 30 min auf Eis gestellt. Nach zweiminütigem Hitzeschock bei 42 °C werden 2 ml L-Broth-Medium (Zimmertemperatur) zu der Zellsuspension gegeben und ein bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. 5 bis 100 µl dieser Zellsuspension werden auf L-Broth-Platten plus entsprechendem Antibiotika oder M9-Platten als Minimalmedium ausplattiert.
Werden die Zellen auf Minimalmedium selektiert, so werden sie zuvor in 5 ml 10 mM NaCl-Lösung gewaschen und danach in 0,5 ml NaCl-Lösung aufgenommen.

2.14. Hefetransformation (Beggs 1978)

Hefezellen werden in Vollmedium (YEPD) bis zur logarithmischen Phase (0,5 bis 1 x 10^8 Zellen/ml) angezogen. Die Zellen werden abzentrifugiert und in 1,2 M Sorbit-Lösung gewaschen. Danach werden die Zellen in 30 ml Helicase-Puffer (1,2 M Sorbit, 10 mM EDTA, 0,1 M tri-Natriumcitrat, pH 5,8) aufgenommen. Der Zellsuspension werden 60 mg Helicase und 0,3 ml 14 M ß-Mercaptoethanol hinzugegeben. Die Protoplastierung erfolgt bei 30 °C für 20 bis 30 min. Die Protoplastenbildung wird kontrolliert, indem ein Aliquot von jeweils 0,3 ml in 3 ml 1,2 M Sorbit-Lösung bzw. Aq.dest. gegeben wird. Durch Platzen der Protoplasten wird die Wasserprobe klar, während die Sorbitlösung trüb bleibt. Die Protoplasten werden abzentrifugiert und dreimal in Sorbitlösung gewaschen. Schließlich werden die Zellen in 100 µl 1,2 M Sorbit/10 mM $CaCl_2$ aufgenommen. Zu je 50 µl Protoplastensuspension werden etwa 5 µg Plasmid-DNA gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 0,5 ml PEG-Lösung (20% (w/v) Polyethylenglykol 4000, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur werden die Protoplasten abzentrifugiert und in 100 µl 1,2 M Sorbit, 10 mM $CaCl_2$ plus 50 µl YEPD-Medium, angesetzt in 1,2 M Sorbit, für eine Stunde bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert, in Sorbitlösung gewaschen und in 3 bis 4 ml Sorbitlösung resuspendiert.
5 bis 100 µl der Protoplastensuspension werden mit 7 ml Regenerations-Top-Agar (YNB-Medium mit 1,2 M Sorbit, 3% (w/v) Agar) vermischt und auf YNB-Platten mit 1,2 M Sorbit ausplattiert. Nach drei bis fünf Tagen Inkubation bei 30 °C sind Transformantenkolonien erkennbar.

2.14.1. Nichtselektive Hefetransformation (Reipen et al., 1982)

Die nichtselektive Hefetransformation entspricht der Methode von Beggs (1978) mit folgenden Modifikationen:
Der Regenerationsagar enthält 0,5% (w/v) Glucose und zusätzlich 0,2% (w/v) Stärke, sowie alle Aminosäuren oder Basen, die der Wirtsstamm zum Wachstum benötigt. Da auf diesem Medium alle regenerationsfähigen Protoplasten wachsen, muß die Protoplastensuspension vor dem Ausplattieren 1:100 bis 1:1000 verdünnt werden.
Zur Identifizierung der Transformanten wird der Jod-Stärke-Test zum Nachweis der ß-Lactamaseaktiviät angewendet (siehe unter 2.17)

2.15. Anfertigung von Heferohextrakten

5 bis 10 ml einer Hefekultur werden in einem Corex-Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Das Hefepellet wird in kaltem 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0 gewaschen, anschließend in 1 ml 0,1 M Tris-HCl, 1 mM PMSF, pH 7,0 aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Zellsuspension wird 1/2 Volumen Glasperlen (0,45 bis 0,50 mm Durchmesser, Braun-Melsungen) hinzugegeben. Vor dem Zellaufschluß im Braun-Melsungen-Homogenisator werden die Zellen für 5 min auf Eis gestellt. Der Aufschluß erfolgt dreimal bei Stufe 1 für jeweils 2 min, wobei die Zellen zwischen den Aufschlüssen für 3 min auf Eis gestellt werden.

Die Zellrohextrakte werden bei -20 °C aufbewahrt.

2.16. Fraktionierung von Hefezellen durch Protoplastierung mit Zymolyase

Zur Trennung der Bestandteile des Cytosols von denen der Hefezellwand, werden die Hefetransformanten mit Zymolyase (Seikagaku Kogyo, Tokio) protoplastiert.
1,5 ml Hefekultur werden in ein Eppendorfgefäß überführt, bei 5000 UpM in einer Eppendorftischzentrifuge abzentrifugiert und in 0,5 ml 1,2 M Sorbit-Lösung gewaschen. Das Hefepellet wird anschließend in 100 bzw. 200 µl Zymolyasepuffer (1,2 M Sorbit, 0,1% (v/v) Mercaptoethanol, 10 mM Na-Azid, 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5) resuspendiert. Der Hefesuspension werden 10 bzw. 20 µl Zymolyase (2,5 mg/ml) hinzugefügt. Die Inkubation mit Zymolyase erfolgt bei 30 °C für 20 min. Die Protoplasten werden bei 3000 UpM für 5 min abzentrigugiert.
Als Zellwandfraktion wird der Protoplastenüberstand verwendet.

Das Protoplastenpellet wird einmal in 1,2 M Sorbitlösung gewaschen, in 0,5 bis 1 ml kaltem 0,1 M Tris-HCl, 1 mM PMSF, pH 7,0 aufgenommen und 20 min auf Eis osmotisch geschockt. Die geplatzten Zellen werden für 10 min bei 10000 UpM kalt abzentrifugiert.
Als Cytoplasmafraktion dient der Überstand der osmotisch geschockten Protoplasten.

Zellwand- und Cytoplasmafraktion werden bei -20 °C aufbewahrt.

2.17. Jod-Stärketest zum Nachweis der ß-Lactamase

Die transformierten Hefezellen werden entweder als Ausstrich oder Einzelkolonien auf Stärkeplatten (0,65% (w/v) Yeast Nitrogen Base, 0,1% (w/v) Glucose, 0,2% (w/v) lösliche Stärke, 0,02 M Phosphatpuffer, 1,8% (w/v) Agar, pH 7,0) für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert.
Die Petrischalen werden nach der Inkubationszeit mit einem Gemisch aus 4 ml Softagar (gleiche Zusammensetzung wie der Nährboden, aber 1% (w/v) Agar) und 1,5 ml Jod-Penicillin-Reagenz (3 mg/ml J_2, 15 mg/ml KJ, 0,02 M Phosphatpuffer, pH 7,0 und 3 mg/ml Penicillin, das kurz vor Gebrauch zugegeben wird) überschichtet und eine Stunde bei 30 °C und anschließend bei 4 °C inkubiert.
ß-Lactamase-positive Hefetransformanten sind an der Entfärbung des dunkelblauen Mediums, verursacht durch den Jod-Stärke-Komplex, zu erkennen. Das Spaltprodukt der ß-Lactamase reduziert das Jod, wodurch der Jod-Stärke-Komplex aufgelöst wird. Die Entfärbung tritt abhängig von der ß-Lactamaseaktivität 0,5 bis 6 Stunden nach Auftragen des Reagenzes auf.

2.18. Nitrocefintest als quantitativer Nachweis der ß-Lactamaseaktivität (nach O'Callaghan et al., 1972)

0,5 mg Nitrocefin (Glaxo-Allenburys Research Ltd, England) werden in 50 µl DMSO gelöst. Diese Stammlösung wird in 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 bis zu einer Extinktion A_{390nm} = ca. 0,9 verdünnt.

Testansatz:
1 ml Testreagenz (30 °C) werden vermischt mit max. 50 µl Probe. Die Messung der Extinktionsabnahme erfolgt bei 390 nm und 30 °C.
Eine Extinktionsabnahme von 0,1 entspricht der Spaltung von 4 Nanomolen Nitrocefin (Roggenkamp, pers. Mitteilung).

2.19. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Heferohextrakte wird nach der Methode von Lowry et al., (1951) bestimmt. Die Rohextrakte werden 1:20 bzw. 1:50 verdünnt. Die Proteinprobe wird mit Aq.dest. auf 0,3 ml aufgefüllt und mit 3 ml Lowry-Mix (98 ml 0,4% (w/v) NaOH, 2% (w/v) Na_2Co_3; 1 ml 2% (w/v) Kaliumnatriumtatrat und 1 ml 1% (w/v) Kupfersulfat·$5H_2O$) vermischt. Die Probe wird 20 min bei 37 °C inkubiert.

Anschließend werden 0,3 ml Folin-Reagenz (1:2 mit Aq.dest. verdünnt) zugegeben, die Probe sofort gut durchmischt und für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert.

Die Messung der Extinktion erfolgt bei 660 nm gegenüber einer Blindprobe ohne Protein.
Der Proteingehalt wird anhand einer Protein-Eichgerade ermittelt. Als Standard dient Rinderserumalbumin.

2.20. Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (nach Laemmli, 1970)

Die Proteinproben werden im Probenpuffer (63 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) ß-Mercaptoethanol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) bei 95 °C denaturiert.

SDS-PAA-Gele werden je nach gewünschtem Trenneffekt mit Konzentrationen von 10 bis 12,5%, oder als Gradientengel von 5 bis 15% gegossen. Als Beispiel ist die Anfertigung eines 12,5%igen Geles beschrieben:

12,6 ml 30%ige Acrylamid-Stammlösung, 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 9,75 ml Aq.dest., 300 µl 10% (w/v) SDS, 12 µl TEMED und 187,5 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung werden für das Trenngel angesetzt. Als Sammelgel werden 4 ml 30%ige Acrylamid-Stammlösung, 4,7 ml Tris-HCl, pH 6,3, 12,6 ml Aq. dest. 187,5 ml 10% (w/v) SDS, 18,7 µl TEMED und 200 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung zusammengegeben.

30%ige Acrylamid-Stammlösung: 30 g Acrylamid, 0,8 g N',N'-Methylen-Bisacrylamid Aq.dest. ad 100 ml. Die Stammlösung wird über Aktivkohle aufgereinigt und filtriert. Die Lösung wird bei 4 °C unter Lichtschutz aufbewahrt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei 4 bis 10 V/cm. Als Elektrophoresepuffer dient 50 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3.

2.21. Anfärbung von SDS-PA-Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue

Das SDS-PA-Gel wird für 3 Stunden in Vorfärbelösung (25mg Coomassie-Brilliant-Blue (Serva, Heidelberg) 10 ml 50%ige Trichloressigsäure (TCA), 37,5 ml Essigsäure, 250 ml Methanol und H_2O ad 500 ml. Die Lösung wird vor Gebrauch filtriert) unter leichtem Schütteln vorgefärbt. Anschließend in Hauptfärbelösung (wie Vorfärbelösung, aber ohne Methanol) für 2 Stunden angefärbt und für ca. 15 Stunden in 7%ige Essigsäure entfärbt. Entfärbelösung wird mehrmals gewechselt.

2.22. Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse (Towbin et al., 1979)

In SDS-PA-Gelen aufgetrennte Proteine werden zusammen mit Whatman Filterpapier und der Nitrocellulose 10 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) eingeweicht. Der Transfer wird in einer "BIO-RAD TRANS-BLOT™ CELL" nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Proteine werden bei 50 V für 2 Stunden bei Raumtemperatur transferiert.
Die transferierten Proteine können mit "Ponceau S Concentrate" (Sigma, USA) reversibel angefärbt werden. Der Farbstoff läßt sich durch mehrmaliges Waschen in Aq.dest. entfernen.

Die Absättigung der Nitrocellulose mit unspezifischem Protein erfolgt für 2 Stunden in 10 ml PBS (10 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,2), mit 10% (v/v) fötalem Kalbsserum.
Die Lösung wird anschließend erneuert, mit 10 µl Antikörpern gegen ß-Lactamase (Roggenkamp et al., 1983) versetzt, und der Filter erneut für 2 Stunden bei 37 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch mehrmaliges waschen in PBS, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (v/v) Kalbsserum, entfernt. Die Nitrocellulose wird anschließend für 2 Stunden mit PBS, 1% (w/v) Rinderserumalbumin, 0,1% (v/v) Tween 20 und 10 µl Protein A, gekoppelt mit Peroxidase (Amersham) behandelt. Überschüssiges Protein A wird durch Waschen mit PBS, 0,1% (v/v) Tween 20 entfernt.
Die Peroxidase/Antikörperkomplexe werden mit Diaminobenzidin (5 mg in 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) in Gegenwart von 0,03% (v/v) H_2O_2 sichtbargemacht. Der Filter wird mit Aq.dest. gewaschen und anschließend getrocknet.

2.23. Behandlung von Rohextrakten und Kulturmedien mit Endoglycosidase H (EndoH)

Zur Abspaltung der N-spezifischen Seitenkettenglykosylierung von Glykoproteinen, werden Rohextrakte bzw. Kulturmedien mit dem Enzym Endo-ß-N-acetylglucosaminidase H (EC 3.2.1.96) (Boehringer, Mannheim) inkubiert. Die Versuchsdurchführung erfolgt in Anlehnung nach den Vorschriften des Herstellers.

Überstände von Kulturmedien werden mit einem Volumen 50 mM Natriumcitratpuffer pH 5,5 versetzt und mit 0,001 bis 0,003 mU EndoH über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Behandlung der Rohextrakte mit EndoH werden Hefezellen bis zu einer OD_{600nm} von etwa 3,0 angezogen. Es erfolgt eine Fraktionierung der Zellbestandteile mit Zymolyase (vgl. 2.16). Nach Inkubation wird das Protoplastenpellet (Cytoplasmafraktion) in 100 µl Puffer aufgenommen (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,5), für 10 min auf Eis gestellt, dann 6 min bei 96 °C unter Zugabe von 10 µl 10%igen SDS inubiert.
Der Protoplastenüberstand (Zellwandfraktion) wird ebenfalls unter Zugabe von 10 µl 10%igen SDS für 6 min bei 96 °C inkubiert.
Jeweils 20 µl der Proben werden mit 1 ml 50 mM Natriumcitratpuffer pH 5,5 versetzt und unter Zugabe von 0,005 mU EndoH über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Heferohextrakte, die nach der Methode 2.15. angefertigt wurden, können ebenfalls mit EndoH inkubiert werden. Eingesetzt werden 2,5 bis 5,0 µl Zellaufschlußmaterial. Der Rohextrakt wird auf 20 µl Endvolumen mit 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 und 2 µl 10%ige SDS aufgefüllt und direkt bei 96 °C für 6 min inkubiert. Anschließend wird die Rohextraktprobe mit 1 ml 50 mM Natriumcitratpuffer pH 5,5 versetzt und unter Zugabe von 0,005 mU EndoH über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.24. Inkubation von Hefekulturen mit Tunicamycin

Hefezellen werden auf Komplettmedium (YEP) mit 5% Glucose bzw. 2% Raffinose bis zu einer OD_{600nm} zwische 1 und 3 angezogen. Der Hefekultur werden Tunicamycin (Sigma, ST Louis U.S.A.) in einer Enkonzentration von 50 µg/ml zugegeben und anschließend für maximal 3 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Anfertigung von Zellaufschlüssen erfolgt nach den Methoden 2.15. oder 2.16.

2.25. Aktivitätsbestimmung der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6P-DH) EC 1.1.1.49

Die Messung der Extinktionszunahme erfolgt bei einer Wellenlänge von 340 nm und 25 °C. Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von Glucose-6-Phosphat. Für die Erstellung einer Eichgerade dient Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Boehringer, Mannheim). Der Testansatz erfolgt in Anlehnung der Glucose-6-phosphatdehydrogenaseaktivitätsbestimmung aus "Biochemica Information" Boehringer Mannheim, West-Germany, Seite 99 - 100

Testansatz: 800 µl 0,1 M Tris-HCl pH 7,5
50 µl 0,1 M $MgCl_2$
30 µl 35 mM Glucose-6-Phosphat
30 µl 11 mM NADP
x µl Enzymprobe
1000 µl Endvolumen, aufgefüllt mit H_2O

2.26. Concanavalin-A-Säulenchromatographie

Die Spitze einer Pasteurpipette wird mit etwas Glaswolle versehen und mit 1,5 ml Concanavalin-A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala Schweden) aufgefüllt. Die Trennstrecke beträgt ca. 10 cm. Proben der Kulturmedien werden aufgetragen. Die Säule wird anschließend mit 3 ml Waschpuffer (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) gewaschen. Die Elution der Glykoproteine erfolgt durch Waschen der Säule mit 6 ml Elutionspuffer (0,5 M Methyl -D-Mannopyranosid, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5).

3. ERGEBNISSE

3.1. Das Plasmid pGR1
Ein Hefevektor mit der vollständigen pBR322-Sequenz

Die Plasmide pGR1-A und pGR1-B (Abb. 2) besitzen neben der vollständigen Sequenz des bakteriellen Plasmids pBR322 ein 2-µm DNA-Anteil aus dem Hefevektor pJDB219 (Beggs et al., 1978; Abb. 2). Die 2-µm DNA-Sequenz in den pGR1 Plasmiden trägt sowohl den 2-µm Replikationsstartpunkt, als auch das leu2-d Gen als Selektionsmarker. Die Hefe-DNA wurde in die PvuII-Schnittstelle des Plasmids pBR322 eingebaut, in einem DNA-Bereich, dem bislang keine bekannte Funktion zugeordnet werden konnte.
Die in dieser Promotionsarbeit vorgestellten Plasmide wurden ausgehend von den bakteriellen Plasmiden pBR322 bzw. pBR325 konstruiert. Die Umwandlung zu geeigneten Hefevektoren erfolgte ausschließlich durch Fragmentaustausch mit pGR1. Diese Vorgehensweise hat zum Vorteil, daß alle Hefevektoren die gleiche 2-µm DNA-Sequenz aufweisen; eine wesentliche Voraussetzung um vergleichende Studien unterschiedlicher ß-Lactamasegenfusionen in der Hefe Saccharomyces cerevisiae durchführen zu können, da hierdurch die Stabilität und Kopienzahl, der verschiedenen Plasmide in der Hefe, ähnlich sein sollten.

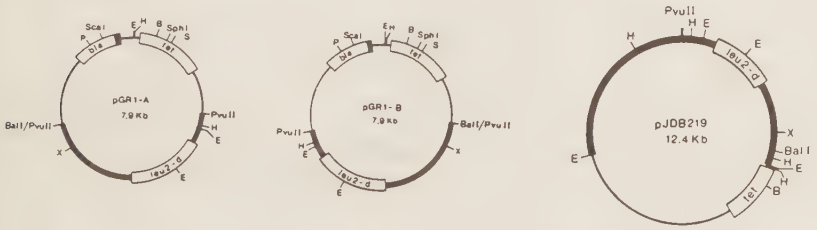


Abb. 2: Die Plasmide pGR1-A und pGR1-B
Der Hefevektor pJDB219 (Beggs et al., 1978) wurde mit den Restriktionsenzymen BalI, BamHI und PvuII verdaut und mit pBR322, geschnitten mit dem Restriktionsenzym PvuII, ligiert. Restriktionsschnittstellen: B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII, S = SalI, P = PstI und X = XbaI. Dicke Linie: 2 µm DNA; dünne Linie: pBR322 bzw. pMB9 beim Vektor pJDB219; schwarzer Balken: Signalsequenzen

Konstruktion von pGR1

PJDB219 (Abb. 2) wurde mit den Restriktionsenzymen BalI, BamHI und PvuII dreifach verdaut und ein Aliquot mit pBR322, geschnitten mit dem Restriktionsenzym PvuII, ligiert.
Der E.coli Stamm JA221 wurde mit dem Ligationsgemisch transformiert und leucinprototrophe Transformanten auf M9-Minimalmedium selektiert.
Von zwölf näher untersuchten Transformanten zeigten sechs zusätzlich Resistenz gegenüber den Antibiotika Ampicillin und Tetrazyklin. Der Nachweis des Einbaus der 2-µm DNA aus pJDB219 in pBR322 erfolgte durch DNA-Minilysatanalyse. Die Restriktionskartierung ergab, daß das Fragment in zwei verschiedenen

Orientierungen vorlag.
Abbildung 2 auf Seite 23 zeigt die Plasmide pGR1-A und pGR1-B. Die beiden Plasmide unterscheiden sich in der Orientierung des leu2-d Gens zu den Antibiotikaresistenzgenen in pBR322.

3.2. Sekretion der ß-Lactamase in S.cerevisiae mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte die Sekretion unterschiedlich großer Proteine (ß-Endorphin, 31 Aminosäuren; α-Interferon, 166 Aminosäuren) mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors in S.cerevisiae nachgewiesen werden (Emr et al., 1983; Brake et al., 1984; Bitter et al., 1984). Das Ausschleusen der Proteine erfolgte mit hoher Effizienz; in einigen Fällen wurden über 90% der synthetisierten Proteine sezerniert (Brake et al., 1984). Bei der Mehrzahl der untersuchten Hybridproteinen handelt es sich um sekretorische eukaryotische Proteine, wobei die ursprünglichen Signalsequenzen gegen die Preprosequenz des Alpha-Faktors ausgetauscht wurden (Emr et al., 1983; Brake et al., 1984; Bitter et al., 1984). Der Einfluß der Preprosequenz auf nicht sekretorische oder prokaryotische Proteine wurde nicht untersucht. Gerade diese Untersuchung könnte jedoch mehr Information über die Bedeutung der Preprosequenz des Alpha-Faktors geben. Deshalb schien die Fusion der Preprosequenz mit der prokaryotischen ß-Lactamase, die in transformierten Hefezellen nur zu etwa 10% sezerniert wird (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf), besonders interessant zu sein. In der ersten Genfusion wurde die Signalsequenz der ß-Lactamase gegen die Preprosequenz des Alpha-Faktors ausgetauscht.

3.2.1. **Das Plasmid pGRT1-22**
Der Austausch der ß-Lactamasesignalsequenz gegen die Preprosequenz des Alpha-Faktors aus S.cerevisiae

Kurjan und Herskowitz isolierten 1982 das Gen des Alpha-Faktors aus S.cerevisiae (Kurjan und Herskowitz 1982). Das Plasmid pJDY15, das uns von Scott Emr freundlicherweise zugesandt wurde, trägt die kodierende DNA-Region für die Preprosequenz des Alpha-Faktors auf einem 1220 Bp großen DNA-Fragment, flankiert durch die Restriktionsschnittstellen EcoRI und SalI (siehe Abb. 3). Durch Einbau des 1220 Bp Fragments in die EcoRI bzw. SalI Restriktionsschnittstellen im Ampicillinresistenzgen des Plasmids pTG2S (siehe Seite 25) erfolgte die Insertion der kodierenden DNA-Region der Preprosequenz des Alpha-Faktors. Ein Fragmentaustausch über die Restriktionsschnittstellen ScaI und SphI des Zwischenprodukts pGRT1-16 mit dem Plasmid pGR1-A führte zum Hefevektor pGRT1-22. Ein Konstruktionsschema ist in Abbildung 3 dargestellt.

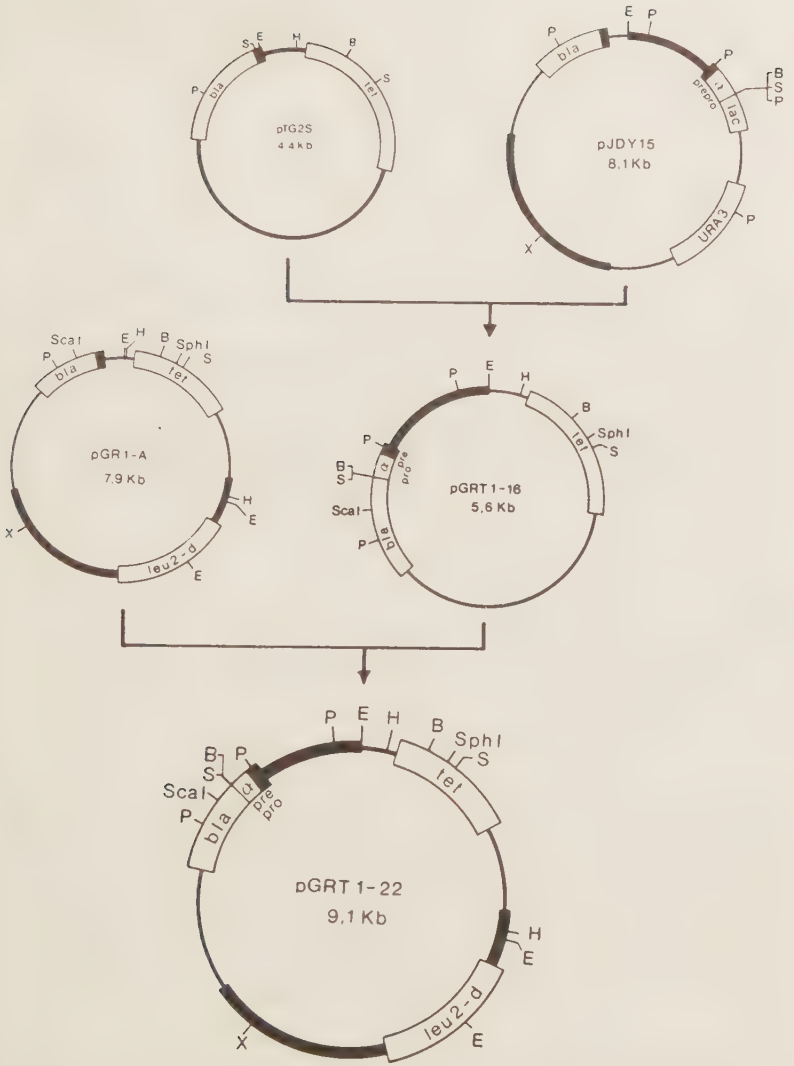


Abb. 3: Konstruktionsschema des Plasmids pGRT1-22

Das Plasmid pJDY15 wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI verdaut. Der Einbau des 1220 Bp Fragments in die EcoRI bzw. SalI Schnittstellen im Ampicillinresistenzgen des Plasmids pTG2S, führte zum Zwischenprodukt pGRT1-16. Durch einen Fragmentaustausch über die Restriktionschnittstellen ScaI und SphI mit dem Plasmid pGR1-A entstand der Hefevektor pGRT1-22. Restriktionsschnittstellen: B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII, S = SalI, P = PstI und X = XbaI. Dicke Linie: 2 µm DNA; dünne Linie: pBR322; schwarzer Balken: Signal- bzw. Presequenzen.

Das Plasmid pTG2S, ein Derivat des Plasmids pTG2 (Kadonaga et al., 1984) besitzt eine SalI-Restriktionsschnittstelle an der Position 61 des ß-Lactamasegens. Die Schnittstelle befindet sich 8 Bp vor der Spaltstelle der Signalsequenz (Vergleiche die unten angegebene DNA-Sequenz).

3.2.2. Sequenzierung der Genfusion αFprepro-ß-Lactamase in pGRT1-22

Der Fusionsbereich des α-Faktor-ß-Lactamase Hybridgens innerhalb des Plasmids pGRT1-22 wurde zur Überprüfung des Leserasters sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach Maxam und Gilbert (Siehe Material und Methoden).
Plasmid-DNA isoliert aus E.coli Minilysaten wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten. Die 5'DNA-Enden wurden radioaktiv markiert, und die endmarkierten DNA-Fragmente mit dem Restriktionsenzym PstI nachverdaut. Die 245 bzw. 480 Bp großen PstI-BamHI-Fragmente wurden über "Low-Melting"-Agarose isoliert und für die Sequenzierungsreaktion aufgereinigt. Die Sequenzierungsstrategie ist in Abbildung 4 dargestellt.

Abb. 4: Sequenzierungsstrategie der Genfusion in pGRT1-22
Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut. Die 5'DNA-Enden wurden radioaktiv markiert und die endmarkierten DNA-Fragmente mit dem Enzym PstI nachverdaut. Die Sequenzierung der 245 bzw. 480 Bp großen BamHI-PstI-Fragmente erfolgte nach Maxam und Gilbert (siehe Material und Methoden). Restriktionsschnittstellen: B = BamHI, S = SalI und P = PstI.

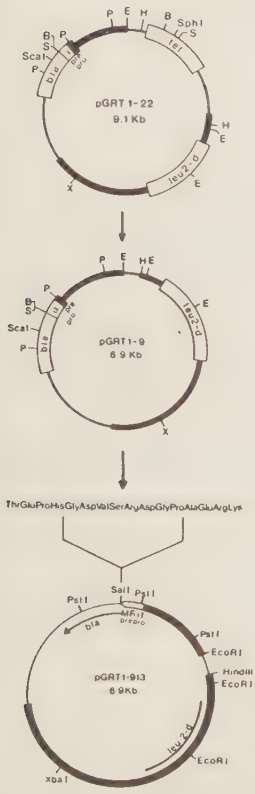
Die Sequenzierung des Fusionsbereiches ergab kein durchgehendes Leseraster. Die ermittelte DNA-Sequenz mit Restriktionsschnittstellen und Aminosäuresequenz lautet:

```
     84  85  86  87                                    23  24
    Lys Arg Glu Ala --------Poly-Linker-------  His Pro ..
5'- AAA AGA GAG GCT CCC GGG GAT CCG TCG ACG GT  CAC CCA .. -3'
    --Alpha-Faktor- -------  --------  ------  -ß-Lactamase-
                      SmaI -------- SalI              gen
                           BamHI
```

Ein intaktes Leseraster innerhalb der Genfusion konnte durch eine Auffüllreaktion und anschließender Ligation der gespaltenen BamHI Schnittstellen hergestellt werden. Die Vorgehensweise wird im folgenden Abschnitt dargestellt.

3.2.3. Das Plasmid pGRT1-913

Ein Hefevektor mit intaktem Leseraster innerhalb der αFprepro-ß-Lactamase Genfusion



Eine Restriktionsverdauung des Plasmids pGRT1-22 mit dem Enzym HindIII und anschließender Religation führte zur Plasmidkonstruktion pGRT1-9. Dieses Plasmid zeichnet sich durch den Verlust des 2200 Bp großen HindIII-DNA-Fragments aus. Dieses Fragment trägt die kodierende Region des Resistenzfaktors gegen Tetrazyklin. Durch diese Konstruktion wurde die zweite BamHI-Schnittstelle entfernt. Das Plasmid pGRT1-9 wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert, die überhängenden 5'DNA-Enden mit Klenow-Polymerase in Gegenwart von Nukleotiden aufgefüllt, und das Plasmid anschließend mit T_4-Ligase religiert. Der E.coli Stamm JA221 wurde mit dem Ligationsgemisch transformiert und auf Minimalmedium auf Leucinprototrophie selektiert. Die Eliminierung der BamHI-Schnittstelle konnte in drei E.coli Transformanten durch Verdauung der isolierten Minilysat-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI nachgewiesen werden. Die Minilysatproben ließen sich durch die Restriktionsverdauung nicht mehr linearisieren.

Abb. 5: Konstruktionsschema des Plasmids pGRT1-913

Das Plasmid pGRT1-22 wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. Die Religation des geschnittenen Plasmids führte zum Hefevektor pGRT1-9. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert, und die überhängenden 5'DNA-Enden mit Klenow-Polymerase in Gegenwart von Nukleotiden aufgefüllt. Die Religation mit T_4-Ligase führte zur Plasmidkonstruktion pGRT1-913. Dieses Plasmid besitzt keine BamHI-Schnittstelle und ein durchgehendes Leseraster innerhalb der Genfusion. Die entsprechende Aminosäuresequenz ist angegeben. Restriktionsschnittstellen: B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII, S = SalI, P = PstI und X = XbaI. Dicke Linie: 2 µm DNA, dünne Linie: pBR322, schwarzer Balken: Signal- bzw. Presequenz.

Es ergibt sich nach dieser Eliminierung der BamHI-Schnittstelle folgende DNA- bzw. Aminosäuresequenz innerhalb des Fusionsbereiches: (Die noch vorhandenen Restriktionsschnittstellen sind ebenfalls angegeben).

```
     84  85  86  87 ---------Poly-Linker---------  23  24
    Lys Arg Glu Ala Pro Gly Asp Arg Ser Val Asp Gly His Pro
5'- AAA AGA GAG GCT CCC GGG GAT CGA TCC GTC GAC GGT CAC CCA-3'
   --Alpha-Faktor-  -------              -------     -ß-Lac-
                     SmaI                 SalI      tamasegen-
```

Für die weiteren Untersuchungen wurde die Minilysatprobe pGRT1-913 verwendet. Das Konstruktionsschema ist in Abbildung 5 dargestellt.

3.2.4. Nachweis aktiver ß-Lactamase im Kulturmedium

Der Hefestamm GRF18 des Alpha-Paarungstyps wurde mit den Plasmiden pGRT1-913 und pADH040-2 als Referenzplasmid transformiert. Der Hefevektor pADH040-2 besitzt das Gen der ß-Lactamase unter Kontrolle des ADH1-Hefepromotors (Reipen et al., 1982).
Hefezellen, die dieses Plasmid tragen, synthetisieren in sehr großer Menge ß-Lactamase. Das Enzym macht etwa 2% des gesamten Zellproteins aus, wovon nur 10% als aktive ß-Lactamase innerhalb der Zelle vorliegt; 90% des Enzyms liegt als enzymatisch inaktives Precursormolekül vor (Roggenkamp et al., 1983, 1985). Das Vorläufermolekül ist sehr instabil, und die genannten Verhältnisse lassen sich nur in Hefetransformanten, die eine niedrige Proteinaseaktivität besitzen, nachweisen (Roggenkamp et al., 1983, 1985). Rohextrakte von GRF18 Transformanten, die das Plasmid pADH040-2 enthalten, zeigen daher ein anderes Verhältnis zwischen prozessierter und nicht prozessierter ß-Lactamase (vgl. Abb. 6, Gelposition H).
Enzymatische Messungen der ß-Lactamaseaktivitäten in Rohextrakten und Kulturmedien zeigen, daß nur etwa 10% der gesamten Enzymaktivität im Medium nachgewiesen werden kann. (Teichmann, Diplomarbeit Düsseldorf). Offensichtlich wird ein Teil der ß-Lactamase im Medium von Transformanten, die das Plasmid pADH040-2 enthalten, durch lysierte Zellen verursacht, da bei immunologischen Untersuchungen auch Precursormoleküle der ß-Lactamase nachgewiesen wurden. Diese Vorstufen der ß-Lactamase werden an freien Ribosomen im Cytoplasma translatiert (Roggenkamp et al., 1983).
Die in pADH040-2 Transformanten erzielten Werte wurden als Referenzwerte genommen.

Die Vorkulturen der Hefetransformanten wurden selektiv auf YNB-Medium angezogen. Die Anzucht der Hauptkulturen erfolgte in Komplett-Medium (YEPD). In Zeitabständen wurden Proben des Kulturüberstandes gezogen und die Enzymaktivität unter Anwendung des Nitrocefintests bestimmt (siehe Material und Methoden). Die Enzymaktivität der ausgeschleusten ß-Lactamase in GRF18/pGRT1-913 Transformanten wurde verglichen mit der ß-Lactamaseaktivität in Zellrohextrakten. Die Ergebnisse sind in den Tabellen II und III auf Seite 29 zusammengefaßt.

Aktive ß-Lactamase läßt sich im Kulturmedium des Hefestammes GRF18, transformiert mit dem Plasmid pGRT1-913, nachweisen. Die Enzymaktivität im Überstand nimmt bereits während der lag-Phase der Zellen in den ersten drei Stunden nach Inokulation zu. Ein deutlicher Zuwachs an Enzymaktivität ist während der logarithmischen Wachstumsphase festzustellen. Vergleicht man die Enzymaktivität im Kulturmedium mit der Aktivität in Zell-Extrakten (Siehe Tabelle III), so wird bis zu 90% der synthetisierten ß-Lactamase ins Medium ausgeschleust. Das Kulturmedium der Hefezellen, transformiert mit dem Plasmid pADH040-2, zeigt wie erwartet nur geringe ß-Lactamaseaktivität.

Tabelle II: Bestimmung der ß-Lactamaseaktivität im Kulturmedium von GRF18/pGRT1-913 und GRF18/pADH040-2 Transformanten

Zeit (h)	GRF18/pGRT1-913		GRF18/pADH040-2	
	OD_{600nm}	Enzymaktivität (mU/ml)	OD_{600nm}	Enzymaktivität (mU/ml)
0	0,6	10	0,6	0
0,5	0,6	31	-	-
1	0,6	48	0,6	0
1,5	0,6	73	-	-
2	0,6	110	0,6	1
2,5	0,7	114	-	-
3	0,8	166	0,6	2
6	1,4	627	1,3	8
12	6,0	9850	6,4	52
30	10,5	12288	10,3	94

Die transformierten Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C auf YNB-Medium selektiv angezogen. 10 ml der Übernachtkulturen wurden in 20 ml sterilem H_2O gewaschen. 100 ml YEPD-Medium wurde mit den gewaschenen Hefezellen angeimpft. Die Zelldichte (OD_{600nm}) betrug 0,6. Die Kulturen wurden für 30 Stunden bei 30 °C inkubiert. In Zeitabständen wurden Proben des Kulturmediums entnommen, die Hefezellen abzentrifugiert, und die ß-Lactamaseaktivität im Überstand unter Anwendung des Nitrocefintests bestimmt (Siehe Material und Methoden). 1 mU ist die Enzymaktivität, die unter den angewendeten Bedingungen 1 nmol 2-Chlor-4-Nitrophenol pro min bei 30 °C freisetzt.

Tabelle III: Vergleich der ß-Lactamaseaktivität in Überständen und Rohextrakten von GRF18/pGRT1-913 Transfomanten

OD_{600nm}	Enzymaktivität 2% Glucose				OD_{600nm}	Enzymaktivität 2% Raffinose			
	Rohextrakt (mU)	(%)	Medium (mU)	(%)		Rohextrakt (mU)	(%)	Medium (mU)	(%)
2,0	229	11	1939	89	3,2	7	11	58	89
4,3	791	12	5904	88	4,5	307	10	2779	90
10,0	926	8	12864	92	9,4	588	8	7099	92
		(10±2)		(90±2)			(10±2)		(90±2)

Die Hefetransformanten wurden auf YEP-Medium mit 2% Glucose bzw. 2% Raffinose bei 30 °C inkubiert. Für den Rohextrakt wurden jeweils 5 ml Hefekultur abzentrifugiert und mit Glasperlen im Braun-Homogenisator aufgeschlossen (Siehe Material und Methoden). Die Enzymmessung und Proteinbestimmung erfolgte nach den im Material und Methodenteil aufgeführten Vorschriften. Die Zahlenangaben beziehen sich jeweils auf 1 ml Kulturmedium bzw. Rohextrakt. Die in Klammern angegebenen Werte geben die Mittelwerte in Prozent an.

Zum Beweis, daß die Nitrocefinspaltung durch freigesetzte ß-Lactamase verursacht worden ist, wurden die Überstände immunologisch untersucht.

3.2.5. Immunologischer Nachweis der ausgeschleusten ß-Lactamase im Kulturmedium

Das Kulturmedium des Hefestammes GRF18 transformiert mit dem Plasmid pGRT1-913 wurde immunologisch untersucht. Die Überstände, entnommen nach 0, 1/2, 1, 2, 3 und 24 Stunden, wurden in einer "Western"-Analyse mit polyklonalen Antikörpern gegen ß-Lactamase hybridisiert. Gleichzeitig wurden Rohextrakte von Hefetransformanten, die das Plasmid pGRT1-913 bzw. pADH040-2 besitzen, untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 6.

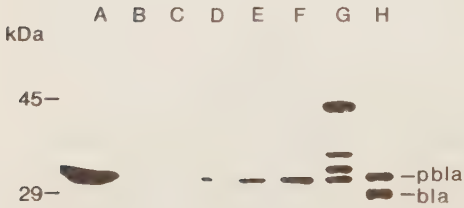


Abb.6: Immunologischer Nachweis der ß-Lactamase im Kulturmedium von GRF18/pGRT1-913 Transformanten

Aus den Überständen der Inkubationszeiten 0, 1/2, 1, 2 und 3 Stunden wurden jeweils 300 µl mit TCA gefällt (Siehe Material und Methoden) und in 20 µl Denaturierungsprobenpuffer nach Laemmli aufgenommen. Der Überstand der 24-stündigen Inkubation wurde nicht gefällt, sondern mit gleichem Volumen Proben-Puffer versetzt. Aus Hefezellen, die bei 30 °C für 24 Stunden gewachsen sind, wurden Rohextrakte angefertigt. Eingesetzt wurden jeweils 10 µl der Rohextrakte aus den Hefetransformanten GRF18/pGRT1-913 und GRF18/pADH040-2. Die Proben wurden über ein 12,5%iges SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit polyklonalen ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert. A) 50 µl Überstand (24 Stunden); B bis F) 300 µl Überstand (0 bis 3 Stunden); G) 10 µl Rohextrakt GRF18/pGRT1-913; H) 10 µl Rohextrakt GRF18/ pADH040-2; pbla = nicht prozessierte ß-Lactamase; bla = prozessierte ß-Lactamase

Das Kulturmedium des Hefestammes GRF18 transformiert mit dem Plasmid pGRT1-913 zeigt eindeutig eine Proteinbande, die mit Antikörpern gegen ß-Lactamase reagiert und während der Wachstumsphase der Hefezellen stärker wird. Die Zunahme der Proteinmenge entspricht der Zunahme der ß-Lactamaseaktivität im Kulturmedium. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinbande im SDS-PA-Gel ist etwas größer als die der nicht prozessierten ß-Lactamase, aber kleiner als die des prozessierten Proteins (Vergleiche mit den Proteinbanden der Gelposition H, Abb.6). Das Molekulargewicht des Proteins beträgt demnach etwa 31000 Dalton. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, daß die Prozessierung der Preprosequenz innerhalb des Hybridproteins nicht, wie zu erwarten wäre, in der Aminosäuresequenz Lys-Arg-Glu-Ala stattfindet. Allerdings ist die Prozessierung des Fusionsproteins, ebenso wie der Alpha-Faktor, abhängig von einer Lysin-Arginin spaltenden Endopeptidase (Siehe Abschnitt 3.5.). Aufgrund des Molekulargewichts läßt sich abschätzen, daß das prozessierte ß-Lactamaseprotein noch etwa 19 zusätzliche Aminosäuren besitzt. Die Spaltstelle würde demnach innerhalb der Prosequenz liegen. Eine denkbare Prozessierungsstelle ist die Aminosäuresequenz Ala-Ala-Lys-Glu-Glu. Diese Sequenz liegt 15 Aminosäuren vor der eigentlichen Spaltstelle der Preprosequenz des Alpha-Faktors. Zusätzliche Prozessierungsstellen wurden auch bei anderen Alpha-Faktorhybridproteinen in Hefe nachgewiesen (Bitter et al., 1984, Brake et al., 1984, siehe Diskussion). Eine Prozessierung innerhalb der Prose-

quenz des Alpha-Faktors konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.
Das hypothetische N-terminale Ende sieht wie folgt aus:

```
          1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11
NH2-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Leu-Asp-Lys-Arg-Glu-Ala-
                    Alpha-Faktor
      12  13  14  15  16  17  18  19  20  21
-Pro-Gly-Asp-Arg-Ser-Val-Asp-Gly-His-Pro...
              Poly-Linker          ß-Lact.
```

Addiert man die Molekulargewichte der 19 zusätzlichen Aminosäuren so erhält man einen Wert von 2284 Dalton. Zum Vergleich: die 23 Aminosäuren der ß-Lactamasesignalsequenz besitzen ein Molekulargewicht von 2663 Dalton. Die Differenz entspricht den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten beider Proteine im SDS-PA-Gel.

Es kann allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß die ß-Lactamasefusion an der Aminosäuresequenz Lys-Arg-Glu-Ala prozessiert wird. Das Protein würde in diesem Fall 10 zusätzliche Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 1127 Dalton aufweisen. Die Aminosäuresequenz würde wie folgt lauten:

```
      1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12
NH2-Glu-Ala-Pro-Gly-Asp-Arg-Ser-Val-Asp-Gly-His-Pro...
Alpha-Fakt.          Poly-Linker              ß-Lact.
```

Die Wanderungsgeschwindigkeit der prozessierten ß-Lactamasefusion im SDS-PA-Gel deutet aber eher daraufhin, daß die erstgenannte Spaltstelle innerhalb der Prosequenz für die Prozessierung des Fusionsproteins von Bedeutung ist. Eine klare Aussage bezüglich der Schnittstelle könnte durch Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuren des prozessierten Proteins erreicht werden.

Die immunologische Untersuchung des Rohextraktes von Hefetransformanten, die das Plasmid pGRT1-913 besitzen (Abb. 6, Gelposition G), zeigt, daß zusätzliche Proteinbanden mit ß-Lactamaseantikörpern reagieren. Die Synthese des Hybridproteins erfolgt über Vorläufermoleküle. Das Molekulargewicht des nicht prozessierten, unglykosylierten Proteins beträgt etwa 40000 Dalton (87 AS Preprosequenz, 10342 Dalton; 8 AS Poly-Linker 784 Dalton und 243 AS reife ß-Lactamase, 29000 Dalton). Auf der Prosequenz des Alpha-Faktors sind drei potentielle Glykosylierungsstellen vorhanden. Die Proteinbande im Rohextrakt, die mit Antikörpern reagiert und die kleinste Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-PA-Gel aufweist, besitzt ein Molekulargewicht von etwa 44500 Dalton. Offensichtlich handelt es sich um die nicht prozessierte glykosylierte Form des Hybridproteins. Das Protein wird vermutlich, wie der Alpha-Faktor, nur core-glykosyliert. Dies bestätigt auch die Untersuchung der Genexpression in kex2 Mutanten (Siehe Abschnitt 3.5.). Die Synthesevorstufen des Hybridproteins werden innerhalb der Zelle über Zwischenprodukte, mit den Molekular-

gewichten 36000 und 32000 Dalton, in das reife enzymatisch aktive Protein umgewandelt, das auch im Medium immunologisch nachweisbar ist.

3.2.6. Untersuchung der ß-Lactamaseinduktion unter Kontrolle des Alpha-Faktor-Promotors in Hefezellen des α und a Paarungstyps

Der Alpha-Faktor wird in haploiden Hefezellen des α-Paarungstyps konstitutiv synthetisiert (Thorner 1981). Die Sekretion des Alpha-Faktors ist offensichtlich eng gekoppelt mit dem Zellwachstum (Schekman und Novick, 1982). In diesem Abschnitt wird untersucht, ob (1) die Synthese der ß-Lactamase in der Plasmidkonstruktion pGRT1-913 ebenfalls zellspezifisch erfolgt, und (2) vom Zellwachstum abhängig ist.

Die Hefestämme GRF18 (α) und AH22 (a) wurden jeweils mit dem Plasmid pGRT1-913 transformiert (GRF18 und AH22 sind isogene Hefestämme unterschiedlicher Paarungstypen). Die Zunahme der ß-Lactamase im Kulturmedium ist in Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV: Bestimmung der sezernierten ß-Lactamase in GRF18 (α) und AH22 (a) Transformanten

GRF18/pGRT1-913		AH22/pGRT1-913	
OD_{600nm}	ß-Lactamase (µg/ml)	OD_{600nm}	ß-Lactamase (ng/ml)
1,0	2	1,2	30
1,6	5	2,0	60
3,2	11	3,2	189
6,0	37	6,0	287
10,2	81	11,3	990

Die mit dem Plasmid pGRT1-913 transformierten Hefestämme GRF18 (α) und AH22 (a) wurden über Nacht bei 30 °C auf YNB-Medium selektiv angezogen. 10 ml der Übernachtkulturen wurden in sterilem H_2O gewaschen. 100 ml YEPD-Medium wurden mit den transformierten Hefestämmen angeimpft. Die Zelldichte (OD_{600nm}) beider Hauptkulturen betrug 0,8. Die Kulturen wurden bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase angezogen. In Zeitabständen wurden Proben des Kulturmediums entnommen. Die sezernierte Enzymmenge wurde über die ß-Lactamaseaktivität ermittelt. Die spezifische Aktivität der ß-Lactamase beträgt 249 Einheiten pro mg Protein (Roggenkamp et al., 1983).

Frisch transformierte GRF18 Hefezellen des α-Paarungstyps, die das Plasmid pGRT1-913 enthalten, sezernieren während der Wachstumsphase bis zu 80 µg/ml aktive ß-Lactamase. Der Hefestamm AH22 (a), transformiert mit pGRT1-913, schleust deutlich weniger Protein aus. Die Werte sind, mit einer Ausnahme, 60 bis 80-fach niedriger als in entsprechenden GRF18 Transformanten. Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Emr und Mitarbeitern. Die Genexpression einer "Alpha-Faktor-Invertase" Fusion ist in a haploiden bzw. a/α diploiden Hefezellen 65 bis 75-fach niedriger als in Zellen des α-Paarungstyps (Emr et al., 1983).

Die ß-Lactamase ist im YEPD-Medium sehr stabil. Kulturmedien mit ß-Lactamase, entnommen aus einer logarithmischen Wachstumsphase und inkukiert bei 30 °C für 100 Stunden, weisen noch bis zu 60% der Enzymaktivität auf. Gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase, etwa ab einer OD_{600nm} von 10, konnte stets eine rasche Abnahme der Enzymaktivität im Medium festgestellt werden. Da die Sekretion des Alpha-Faktors eng gekoppelt ist mit Zellwachstum (Schekman und Novick, 1982), bestand das Interesse der Frage nachzugehen, ob auch die Sekretion der ß-Lactamase vom Zellwachstum abhängig ist. Hierzu wurden GRF18/pGRT1-913 Transformanten auf YEPD-Medium zur stationären Wachstumsphase angezogen. Proben der Hefekultur wurden nach 12, 24, 30, 48 und 70 Stunden entnommen und auf einem 12,5%igem SDS-PA-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Blue angefärbt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 7.

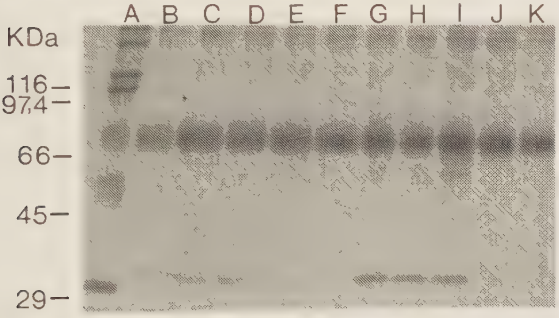


Abb. 7: Untersuchung der sezernierten ß-Lactamase auf Abhängigkeit vom Zellwachstum
GRF18/pGRT1-913 Transformanten wurden auf YEPD-Medium bei 30 °C inkubiert. In Zeitabständen wurden Proben des Kulturmediums genommen und über ein 12,5%iges SDS-PA-Gel aufgetrennt (Siehe Material und Methoden). Als Referenzwert wurden 10 µg BSA (66000 Dalton) pro Gelspur mit aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie-Blue angefärbt.
Aufgetragen wurden jeweils 25 und 50 µl Kulturüberstand. Die Zelldichten (OD_{600nm}) zu den Entnahmezeiten betrugen: 6,2 (12 Stunden); 8,4 (24 Stunden); 10,1 (30 Stunden); 12,0 (48 Stunden); 12,0 (70 Stunden).
A) Proteinmarker, B - F) 25 µl Überstandprobe der Zeiten 12, 24, 30, 48 und 70 Stunden, G - K) 50 µl Überstandprobe der Zeiten 12, 24, 30, 48 und 70 Stunden.

Die immunologische Untersuchung der Proteinsekretion (vgl. Abb.6) zeigte, daß bereits in der lag- und frühen logarithmischen Wachstumsphase von GRF18/pGRT1-913 Transformanten ß-Lactamase ins Medium sezerniert wird. Diese Daten konnten auch durch Aktivitätsbestimmungen der ß-Lactamase im Medium bestätigt werden (vgl. Tab II). Wie aus der Abbildung 7 hervorgeht, ist eine Zunahme der ß-Lactamasekonzentration auch während der spätlogarithmischen Wachstumsphase zu verzeichnen. In der stationären Wachstumsphase ist eine rasche Abnahme der ß-Lactamasekonzentration zu beobachten. Offensichtlich wird keine weitere ß-Lactamase sezerniert. Die Sekretion der ß-Lactamase ist demnach korreliert mit dem Zellwachstum der Hefe. Als Ursache für die Abnahme der ß-Lactamasekonzentration in der stationären Phase können zwei Faktoren genannt werden: (1) Gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase erfolgt eine pH-Verschiebung zum sauren Bereich. Die ß-Lactamase ist unter diesen Bedingungen nicht stabil (Roggenkamp, pers. Mitteilung), (2) Hefezellen verstärken bei ungünstigen Wachstumsfaktoren ihre Proteinaseaktivitäten. So zeigen Hefezellen, die auf Minimalmedium angezogen werden, gegenüber den auf Vollme-

dium inkubierten Zellen eine verstärkte Proteinaseaktivität (Tsai et al., 1973; Fergunson et al., 1973).

Da im Vollmedium die ß-Lactamase recht stabil ist und eine pH-Verschiebung erst gegen Ende des logarithmischen Zellwachstums eintritt, wurde dieses Medium für die Untersuchung der ß-Lactamasesekretion dem Minimalmedium vorgezogen.

Das mit Coomassie-Blue angefärbte SDS-PA-Gel (siehe Abb. 7) kann zur groben Abschätzung der ß-Lactamasekonzentration herangezogen werden. Als Referenzwert dient die Proteinbande des Rinderserumalbumins (BSA) mit dem Molekulargewicht von 66000 Dalton. Pro Gelspur wurden 10 µg BSA aufgetragen. In der spätlogarithmischen Wachstumsphase der hier untersuchten Hefekultur betrug die ß-Lactamasekonzentration etwa 20 bis 30 µg/ml (vgl. hierzu die Werte der Tab. IV auf Seite 32).
Da als Ausgangsmaterial für den Versuch eine Hefekolonie von einer zwölf Wochen alten Transformationsplatte verwendet wurde, ist die verhältnismäßig niedrige ß-Lactamasekonzentration auf eine Verringerung der Kopienzahl des Plasmids pGRT1-913 zurückzuführen. Es ist bekannt, daß die von 2-µm DNA abgeleiteten Plasmide eine Wechselwirkung mit der endogenen 2-µm DNA zeigen und auf Dauer instabil sind (Erhard und Hollenberg, 1981). Aus diesem Grund variieren auch die Werte der ermittelten ß-Lactamaseaktivitäten im Kulturmedium von GRF18/pGRT1-913 Transformanten; die Verhältnisse der Enzymaktivitäten in Rohextrakten und Medien werden hierdurch nicht beeinflußt (vgl. die Werte der Tab. II, III, und X).

Die Synthese und Sekretion der ß-Lactamase im Hefestamm GRF18 erfolgt mit hoher Effizienz. Bis zu 90% der aktiven ß-Lactamase wird aus GRF18 Hefezellen ausgeschleust (vgl. Tabelle III und X). Vergleicht man die Sekretionsrate der ß-Lactamase mit der Sekretion eukaryotischer Proteine, die ebenfalls mit der Preprosequenz des Alpha-Faktors fusioniert wurden, so läßt sich eine Übereinstimmung nachweisen. Hefetransformanten, angezogen bis zu einer OD_{650nm} von 4 sezernieren etwa 5 µg/µl des epidermalen menschlichen Wachstumshormons. Das ausgeschleuste Protein besitzt ein Molekulargewicht von 5500 Dalton (Brake et al., 1984). Zum Vergleich sezernieren frisch transformierte GRF18 Hefezellen, die das Plasmid pGRT1-913 besitzen, bei einer OD_{600nm} von 3 etwa 10 µg/ml (vgl. hierzu Tab. IV und Abschnitt 3.4.4. auf den Seiten 59-62). Für das ß-Endorphin, das mit 31 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 3770 Dalton aufweist, konnten im Kulturmedium von Hefetransformanten, die bis zur OD_{600nm} von 1 angezogen wurden, eine Proteinkonzentration von 0,15 bis 0,2 µg/µl nachgewiesen werden (Bitter et al., 1984). GRF18/pGRT1-913 Transformanten sezernieren bei gleicher OD etwa 2 µg/µl ß-Lactamase (vgl. Tab. IV). Diese Vergleiche zeigen, daß auf molare Verhältnisse bezogen, die Sekretion der prokaryotischen ß-Lactamase mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors in transformierten Hefezellen vergleichbar ist mit der Sekretion eukaryotischer Fusionsproteine.

3.3. Untersuchung des Einflußes N-terminaler Aminosäuresequenzen der Invertase auf die ß-Lactamasesekretion in S.cerevisiae

Ähnliche Experimente zur Proteinsekretion in Hefe, wie zuvor beim Alpha-Faktor beschrieben, wurden auch mit Hilfe der Signalsequenz der Invertase durchgeführt (Smith und Gill, 1985; Chang et al., 1986). DNA-Sequenzen des SUC2-Gens, kodierend für die Signalsequenz der Invertase, wurden mit sekretorischen eukaryotischen Genen fusioniert. Auf diese Weise konnte die Sekretion des Kalbs-Prochymosins und des menschlichen α-Interferons in Hefe nachgewiesen werden.
Die erwähnten Experimente geben jedoch keine Information darüber, welchen Einfluß zusätzliche Aminosäuren der Invertase auf die Sekretion eines Fusionsproteins ausüben. Ein Experiment, das hierüber mehr Aussagen könnte, wurde von Emr und Mitarbeitern durchgeführt (Emr et al., 1984). Sie untersuchten den Einfluß N-terminaler Aminosäuresequenzen der Invertase auf die Sekretion des cytoplasmatischen Proteins der prokaryotischen ß-Galaktosidase. Eine Sekretion der Hybridproteine konnte in Hefe hicht nachgewiesen werden. Die Autoren wiesen darauf hin, daß möglicherweise das cytoplasmatische Protein nicht in der Lage ist, die ER-Membran vollständig zu passieren.
Es schien daher lohnenswert, dieses Experiment mit der sekretorischen ß-Lactamase zu wiederholen. Zur Untersuchung des Einflußes N-terminaler Aminosäuresequenzen der Invertase auf die ß-Lactamasesekretion wurden DNA-Fragmente des SUC2-Gens vor die kodierende Sequenz der reifen ß-Lactamase integriert. Die Regulation und Translokation der Hybridproteine wurde sowohl enzymatisch als auch immunologisch in transformierten Hefezellen untersucht.

3.3.1. **Das Plasmid pINV325**
Der Einbau des SUC2-Gens aus pRB58 in pBR325

Durch eine Teilverdauung des Hefegenoms mit dem Restriktionsenzym Sau3A isolierten Carlson und Botstein 1982 das SUC2-Gen (Carlson und Botstein 1982). Der Hefevektor pRB58, der uns freundlicherweise von David Botstein zur Verfügung gestellt wurde, trägt dieses Gen auf einem etwa 7000 Bp DNA-Fragment. Eine Charakterisierung des Plasmids pRB58 durch Restriktionskartierung ergab, daß das SUC2-Gen auf einem von EcoRI-Restriktionsschnittstellen flankierten, etwa 4500 Bp großen DNA-Fragment lokalisiert ist. Die Verdauung des Plasmids pRB58 mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Einbau des SUC2-tragenden EcoRI-Fragmentes in die EcoRI-Schnittstelle des Chloramphenicolgens in pBR325, führte zur Plasmidkonstruktion pINV325.
Zwei Anforderungen wurden an die Plasmidkonstruktion pINV325 gestellt: (1) Mit Hilfe des Plasmids sollten günstige Restriktionsschnittstellen innerhalb des SUC2-Gens für eine spätere Bal31-Verdauung nachgewiesen werden, und (2) sollte die Konstruktion für eine Fusion des SUC2-Gens mit dem ß-Lactamasegen geeignet sein.

Plasmidkonstruktion

Das Plasmid pBR325 wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut. Aus dem Hefevektor pRB58 konnte das 4500 bp große DNA-Fragment mit Hilfe der DEAE-Methode (siehe Material und Methoden) isoliert und mit dem geschnittenen pBR325-Plasmid ligiert werden. JA221 E.coli Zellen wurden mit dem Ligationsgemisch transformiert und auf LB-Ampicillin Platten selektiert. Aus E.coli Transformanten des Phänotyps Amp^r, Tet^r und Cm^s erfolgte die DNA-Isolierung. Die Minilysatproben 7 und 57 zeigten den Einbau des gewünschten DNA-Fragmentes in pBR325. Das SUC2-Gen lag in den beiden DNA-Proben in unterschiedlichen Orientierungen vor. Abbildung 8 zeigt das Plasmid pINV325-57, Abbildung 9 eine Restriktionsanalyse der beiden isolierten Plasmide pINV325-7 und pINV325-57.

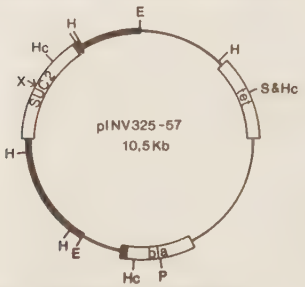


Abb. 8: Das Plasmid pINV325-57
Restriktionsschnittstellen B=BamHI, E = EcoRI, Hc = HincII, H = HindIII, S = SalI, P = PstI, X = XbaI. Dünne Linie: pBR325; dicke Linie: Hefe DNA; schwarzer Balken: Signalsequenz

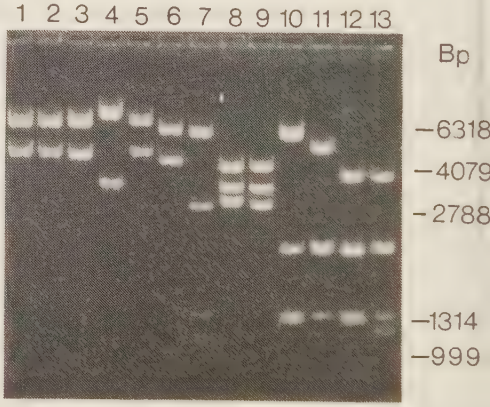


Abb. 9: Restriktionsverdauung der Plasmide pINV325-7 und pINV325-57
1) pINV325-7 EcoRI 2) pINV325-57 EcoRI
3) " BamHI 4) " BamHI
5 - 7) Marker
8) pINV325-7 HincII 9) pINV325-57 HincII
10) pINV325-7 HindIII 11) pINV325-5 HindIII
12) " HindIII/PstI
13) pINV325-57 HindIII/PstI

3.3.2. Untersuchung des SUC2-Gens auf Restriktionsschnittstellen

Das Plasmid pINV325-7 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und näher charakterisiert. Die Abbildung 10 zeigt das Ergebnis. Die Einzelrestriktionsschnittstellen im SUC2-Gen sind unterstrichen wiedergegeben. Die Ergebnisse stimmten mit der später veröffentlichten Invertase-DNA-Sequenz überein (Taussing und Carlson, 1983).

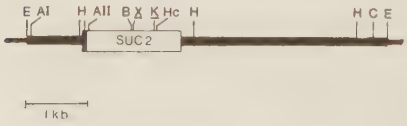


Abb. 10: Analyse der Einzelrestriktionsschnittstellen innerhalb des SUC2-Gens in pINV325-7
Restriktionsschnittstellen AI = AvaI, AII = AvaII, B = BamHI, C = ClaI, E = EcoRI, Hc = HincII, H = HindIII, K = KpnI, X = XbaI.

3.3.3. Konstruktion von Bal31-Deletionen innerhalb des Invertasegens

Von der XbaI-Restriktionsschnittstelle an der Position 832 des SUC2-Gens in pINV325-57 erfolgte die Verdauung mit der Exonuclease Bal31. Die linearisierten DNA-Moleküle wurden mit Nukleotiden aufgefüllt und in Gegenwart von SalI-Linkern ligiert. Die Inkubationszeiten im niedrig Salzpuffer (siehe Material und Methoden) mit 12 Einheiten Bal31 betrugen 6, 7, 8 und 9 Minuten. Der E.coli Stamm JA300 wurde mit dem Ligationsgemisch transformiert und auf LB-Tetrazyklin Platten selektiert. Zur Ermittlung der Deletionsgrößen wurden jeweils die Transformanten einer Platte zusammengefaßt. Die DNA aus den E.coli Zellen wurde über einen $CsCl_2$-Gradienten aufgereinigt und anschließend mit dem Restriktionsenzym SalI verdaut.

Tabelle V: Ermittlung der Bal31-Deletionsgrößen innerhalb des SUC2-Gens durch Restriktionsanalyse:

Zeit (min)	Deletionsgröße (bp)	Nucleaseaktivität (bp/min)
6	ca. 300	ca. 50
7	" 500	" 70
8	nicht ermittelt	nicht ermittelt
9	ca. 1100	" 120

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Deletionen in Richtung des 5'Endes des SUC2-Gens ausgehend von der XbaI-Schnittstelle an Position 832 des Invertasegens.

3.3.4. **Der Hefevektor pHVOS**
Ein Hefevektor konstruiert zum Einbau der deletierten SUC2-DNA-Fragmente

Die Plasmidkonstruktion pHVOS ermöglichte den Einbau der deletierten SUC2-DNA-Fragmente vor die kodierende DNA-Sequenz der reifen ß-Lactamase. Ein Schema des Fragmenteinbaus gibt Abbildung 11 wieder. Das Plasmid pHVOS erhält bei der richtigen Orientierung des SUC2-Gens zum ß-Lactamasegen ein intaktes Tetrazyklinresistenzgen. Durch Transformation von E.coli Zellen und Selektion auf LB plus Tetrazyklin läßt sich der Einbau der SUC2-DNA-Fragmente phänotypisch nachweisen.

Plasmidkonstruktion

Ein Fragmentaustausch innerhalb des Plasmids pTG2S (Siehe Seite 26) über die Restriktionsschnittstellen PstI und BamHI mit pGR1-B führte zum Hefevektor pHV2S. Dieser Vektor besitzt eine SalI-Schnittstelle im Ampicillinresistenzgen und eine weitere Schnittstelle im Tetrazyklinresistenzgen (siehe Abb. 11). Durch Verdauung des Plasmids pHV2S mit dem Restriktionsenzym SalI und anschließender Ligation konnte das Plasmid pHVOS aus E.coli Transformanten des Phänotyps Leu^+, Amp^S und

Tet^S isoliert werden. Bei diesen Plasmidkonstruktionen fehlen sowohl im Ampicillinresistenz- als auch im Tetrazyklinresistenzgen DNA-Sequenzen der 5'Genbereiche.

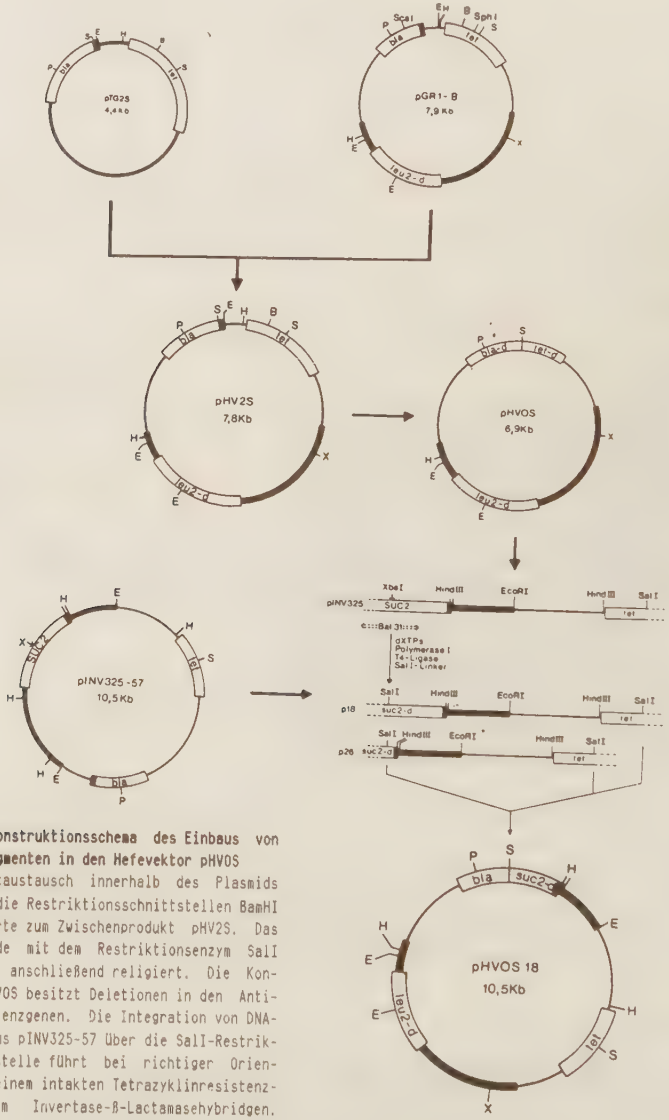


Abb. 11: Konstruktionsschema des Einbaus von Invertasefragmenten in den Hefevektor pHVOS
Der Fragmentaustausch innerhalb des Plasmids pTG2S über die Restriktionsschnittstellen BamHI und PstI führte zum Zwischenprodukt pHV2S. Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym SalI verdaut und anschließend religiert. Die Konstruktion PHVOS besitzt Deletionen in den Antibiotikaresistenzgenen. Die Integration von DNA-Fragmenten aus pINV325-57 über die SalI-Restriktionsschnittstelle führt bei richtiger Orientierung zu einem intakten Tetrazyklinresistenzgen und einem Invertase-ß-Lactamasehybridgen. Als Beispiel ist die Plasmidkonstruktion pHVOS18 dargestellt. B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII, S = SalI, P = PstI und X = XbaI. Dicke Linie: S.cerevisiae DNA; dünne Linie: pBR322 bzw. pBR325; schwarzer Balken: Signalsequenzen.

3.3.5. **Die Plasmidkonstruktionen pHVOS1 bis pHVOS26** Hefevektoren mit Invertase-ß-Lactamase-Hybridgenen

Minilysat-DNA wurde aus E.coli Transformanten isoliert, die mit den deletierten pINV325-57 DNA-Proben (Siehe Seite 37) transformiert worden waren. Abbildung 12 zeigt die DNA-Minilysate der E.coli Transformanten 1 bis 20 nach einer SalI-Restriktionsverdauung.

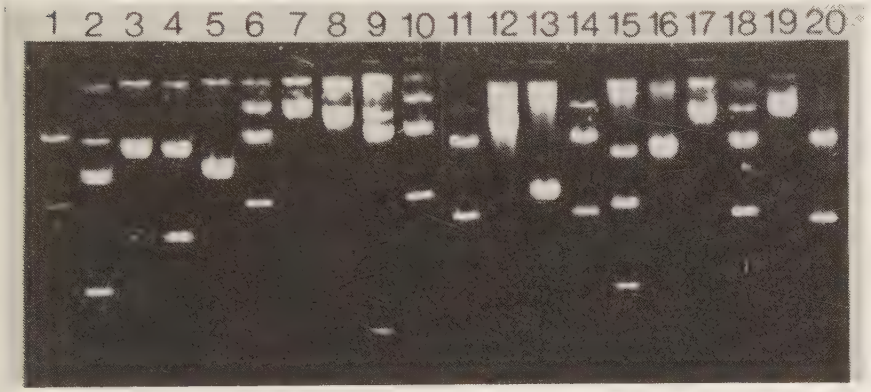


Abb. 12: DNA-Minilysatverdauung mit dem Restriktionsenzym SalI
Je 15 µl DNA-Probe der Minilysate 1 bis 20 wurde mit 1 U Restriktionsenzym SalI verdaut. Die verdauten DNA-Proben wurden auf einem 0,7%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Minilysate 1, 2, 4, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 18 und 20 wurden für die Invertase-ß-Lactamasefusionen verwendet (Siehe Text).

55% der DNA-Proben zeigten den Einbau der SalI-Schnittstelle. Wie Abbildung 12 zeigt, waren dies die Minilysatproben 1, 2, 4, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 18 und 20, die für die Konstruktion verwendet wurden. Die positiven DNA-Proben wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym PvuII vorverdaut und mit dem Enzym SalI nachgeschnitten. Die Fällung der Minilysatproben erfolgte zusammen mit SalI-geschnittenem pHVOS in 70%igem Ethanol. Die gefällte DNA wurde in 10mM Tris-HCl (pH 7,4) aufgenommen und mit T_4-Ligase ligiert. Der E.coli Stamm JA300 wurde mit den Ligationsgemischen transformiert und auf LB plus Tetrazyklin selektiert. Das Konstruktionsschema zeigt Abbildung 11 auf Seite 38.

3.3.6. Invertase-ß-Lactamasehybridgene vermitteln Ampicillinresistenz in E.coli

DNA-Minilysatanalysen der tetrazyklinresistenten E.coli Transformanten zeigten den Einbau der gewünschten SalI-Fragmente in pHVOS. Die DNA-Ligationen der Proben 4 und 15 führten nach Transformation nicht zu tetrazyklinresistenten E.coli Zellen. Von zehn weiteren DNA-Ligationen konnte nur mit der Minilysatprobe 26 nach Ligation E.coli Transformanten erzielt werden.

Da der Vektor pHVOS, wie bereits beschrieben, in E.coli keine Ampicillinresistenz vermittelt, war von Interesse, ob ein DNA-Fragmenteinbau zu der Antibiotikaresistenz führen würde. Um eine solche Resistenz in E.coli vermitteln zu können, müßte das Hybridgen folgende Bedingungen erfüllen:
1) Der Invertasepromoter ist aktiv in E.coli und führt zur Transkription des Hybridgens.
2) Unter Einbehaltung des korrekten Leserasters besitzt das Genprodukt ß-Lactamaseaktivität.
3) Die Funktion der eukaryotischen Signalsequenz wird in E.coli erkannt, und das Hybridprotein befindet sich im periplasmatischen Raum der E.coli Zelle.

Zum Nachweis der Ampicillinresistenz wurden die E.coli Transformanten auf LB plus Ampicillin (150 µg/ml) selektiert. Das Ergebnis ist in Tabelle VI zusammengefaßt.

Tabelle VI: Ampicillinresistenz in mit pHVOS-Plasmiden transformierten E.coli Zellen

Plasmidbezeichnung	Zellwachstum auf Ampicillin (150 µg/ml)
pHVOS1	-
pHVOS2	-
pHVOS6	+
pHVOS9	-
pHVOS10	-
pHVOS14	+
pHVOS18	+
pHVOS20	-
pHVOS26	+

Die E.coli (JA300) Transformanten wurden auf LB-Platten mit einer Ampicillinkonzentration von 150 µg/ml ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
(+) Wachstum; (-) kein Wachstum auf LB plus Ampicillin.

Die Plasmidkonstruktionen pHVOS6, 14, 18 und 26 vermitteln Ampicillinresistenz in transformierten E.coli Zellen. Offenbar kodieren diese Plasmide enzymatisch aktive ß-Lactamasefusionsproteine. E.coli Transformanten, die das Plasmid pHVOS18 enthielten, wurden auf die Translokation des Fusionsproteins näher untersucht (Roggenkamp et al., 1986). Tatsächlich konnte ein aktives Fusionsprodukt im periplasmatischen Raum der E.coli Zellen nachgewiesen werden. Die Daten zeigten, daß die Invertasesignalsequenz zu einer Translokation des Fusionsproteins in E.coli führt.

Im nächsten Abschnitt werden die Größen der SUC2-DNA-Fragmente in den Plasmidkonstruktionen pHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26 bestimmt, und es wird untersucht, ob enzymatisch aktive ß-Lactamasehybridproteine auch in transformierten Hefezellen nachgewiesen werden können.

3.3.7. Ermittlung der SUC2-Fragmentgrößen der Plasmide pHVOS6 pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26

Die Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen SalI/EcoRI, HindIII/PstI doppelt verdaut, die DNA-Fragmente über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, und die Größen der SUC2-Fragmente ermittelt. Die Ergebnisse der Verdauungen sind in Abbildung 13 wiedergegeben. Die Berechnung der SUC2-Fragmente ergab folgende Werte:

pHVOS6	756 ± 45 Bp
pHVOS14	800 ± 30 Bp
pHVOS18	756 ± 45 Bp
pHVOS26	150 ± 10 Bp

Die Standarabweichung wurde bestimmt aus errechnten SUC2-Fragmentgrößen verschiedener Verdauungsansätze.

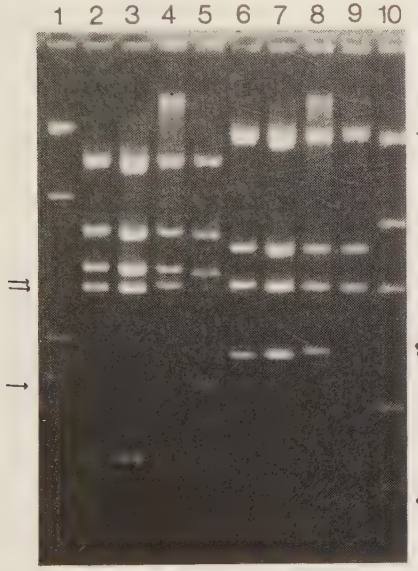


Abb. 13: Ermittlung der SUC2-Fragmentgrößen der Plasmide pHVOS6, 14, 18 und 26

Über $CsCl_2$-Gradienten gereinigte Plasmid-DNA-Proben wurden mit den Restriktionsenzymen SalI/EcoRI und HindIII/PstI doppelt verdaut. Eingesetzt wurden etwa 1 µg DNA. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 1%iges Agarosegel. Mit Pfeilen sind die unterschiedlich großen SUC2-Fragmente der Konstruktionen pHVOS6, 14, 18 und 26 gekennzeichnet.

1) DNA-Marker, BTY-P_2 (HindIII)
2) pHVOS6 (SalI/EcoRI)
3) pHVOS18 (SalI/EcoRI)
4) pHVOS14 (SalI/EcoRI)
5) pHVOS26 (SalI/EcoRI)
6) pHVOS6 (HindIII/PstI)
7) pHVOS18 (HindIII/PstI)
8) pHVOS14 (HindIII/PstI)
9) pHVOS26 (HindIII/PstI)
10) DNA-Marker, BTY-P_2 (XbaI/EcoRI)

3.3.8. Nachweis enzymatisch aktiver ß-Lactamasehybridproteine in S.ceresisiae

Der Nachweis der ß-Lactamaseaktivität erfolgte mit Hilfe des Jod-Stärke-Tests und unter Anwendung des Nitrocefintests.

Da Hybridproteine oft eine Überempfindlichkeit gegen Proteinase zeigen und rasch degradieren, wurde der mutierte Hefestamm EK1 mit den Plasmiden pHVOS1, pHVOS6, pHVOS10, pHVOS14, pHVOS18, pHVOS20 und pHVOS26 transformiert. Der Hefestamm EK1 trägt die pep4-3 Mutation und zeichnet sich durch eine niedrige Proteinaseaktivität aus. Diese Mutation reduziert die Aktivitäten der Proteinase A, B und der Carboxypeptidase Y auf 10%, 7% und 3% der Aktivität normaler Hefezellen (Hemmings et al., 1981).

Nachweis der ß-Lactamaseaktivität auf Jod-Stärke-Platten

Die transformierten Hefezellen wurden auf Jod-Stärke-Platten selektiv angezogen. Nach Überschichten mit dem Jod-Stärke-Reagenz zeigten die Transformanten mit den Plasmiden pHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26 eine Entfärbung des Jod-Stärke-Komplexes. Hefetransformanten mit den Plasmiden pHVOS1, pHVOS10 und pHVOS20 zeigten keine Entfärbung des Jod-Stärke-Komplexes (siehe Abb. 14). Auch bei Hefetransformanten, die die Konstruktionen pHVOS2 und pHVOS9 enthielten, konnte keine Farbreaktion beobachtet werden.

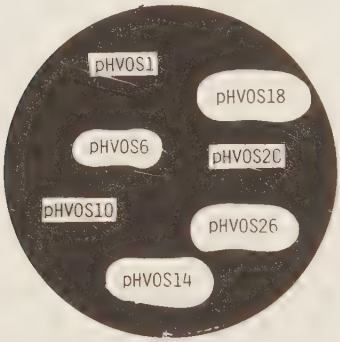


Abbildung 14: Nachweis der ß-Lactamaseaktivität auf Jod-Stärke-Platten
Transformierte Hefezellen wurden für zwei Tage auf Jod-Stärke-Platten bei 30 °C inkubiert und anschließend mit Jod-Stärke-Reagenz überschichtet (siehe Material und Methoden). ß-Lactamase-positive Transformanten entfärben den Jod-Stärke-Komplex.

Bestimmung der Aktivität der ß-Lactamasehybridproteine unter reprimierten und dereprimierten Wachstumsbedingungen

Die ß-Lactamaseaktivität der Rohextrakte wurde mit Hilfe des Nitrocefintests bestimmt.
Der Promotor des Invertasegens wird durch Glucose reguliert (Gascon und Lampen, 1968). Die transformierten Hefezellen wurden über Nacht auf YNB-Medium mit 5,0 % Glucose (reprimiert) bzw. 0,5 % Glucose (dereprimiert) angezogen. Der Aufschluß der Hefezellen erfolgte im Braun-Homogenisator mit Glasperlen. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII zusammmengefaßt.

Tabelle VII: ß-Lactamaseaktivität der Hybridproteine in Zellrohextrakten des Hefestammes EK1

Hefestamm	Plasmid	ß-Lactamaseaktivität (reprimiert) (mU/mg)	ß-Lactamaseaktivität (dereprimiert) (mU/mg)
EK1	untransformiert	n.b.	0,7
"	pHVOS1	n.b.	1,3
"	pHVOS6	8	102
"	pHVOS10	n.b.	0,7
"	pHVOS14	3	56
"	pHVOS18	13	131
"	pHVOS20	n.b.	0,7
"	pHVOS26	5	119

Die transformierten Hefezellen wurden auf YNB-Medium mit 5,0 bzw. 0,5% Glucose selektiv über Nacht bei 30 °C angezogen. Für die Rohextrakte wurden jeweils 10 ml Hefekultur abzentrifugiert und im Braun-Homogenisator aufgeschlossen. Die ß-Lactamaseaktivität und der Proteingehalt der Rohextrakte wurde ermittelt (siehe Material und Methoden).

Wie bereits unter 3.3.6. für E.coli Zellen gezeigt wurde, so läßt sich auch in Hefetransformanten, die die Plasmide pHVOS6, 14, 18 und 26 enthalten, ß-Lactamaseaktivitäten nachweisen. In Zellaufschlüssen von dereprimierten EK1 Hefetransformanten, mit den Plasmidkonstruktionen pHVOS6, 18 und 26, ist die Enzymaktivität etwa 4-fach niedriger als in AH22 Hefezellen, die das Referenzplasmid pADH040-2 enthalten (Reipen, Diplomarbeit 1982).
Das Fusionsprotein der Plasmidkonstruktion pHVOS14 besitzt eine geringere Aktivität in Heferohextrakten. Die Plasmide pHVOS1, 10 und 20 hingegen kodieren in Hefe- und E.coli Transformanten keine enzymatisch aktiven Fusionsproteine.

Wie aus der Tabelle VII ersichtlich ist, wird die Synthese der aktiven Proteine in den Hefetransformanten durch Glucose reguliert. Unter reprimierten Wachstumsbedingungen ist die Syntheserate 10 bis 20-fach niedriger als unter dereprimierten Anzuchtbedingungen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Proteinen, die unter Kontrolle des Invertasepromotors auf Plasmiden mit hoher Kopienzahl pro Zelle synthetisiert werden (Carlson und Botstein, 1982; Emr et al., 1984).

Im nächsten Abschnitt wird untersucht, ob das Kulturmedium der transformierten Hefezellen ß-Lactamaseaktivität enthält.

3.3.9. Untersuchung des Kulturmediums der EK1 Transformanten auf ß-Lactamaseaktivität

Die Kulturmedien des Hefestammes EK1, transformiert mit den Plasmiden pHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26, wurden auf ß-Lactamaseaktivität untersucht. Die Transformanten wurden für eine Nacht selektiv auf YNB-Medium angezogen und auf YEP-Medium mit 2 % Raffinose unter dereprimierten Bedingungen inkubiert. Die Hauptkulturen wurden bis zu einer OD_{600nm} von 10 bei 30 °C angezogen. Das Ergebnis ist in Tabelle VIII auf Seite 44 zusammengefaßt.

In den Kulturmedien der transformierten Hefezellen lassen sich ß-Lactamaseaktivitäten nachweisen. Die Enzymaktivitäten sind jedoch sehr niedrig und vergleichbar mit den Aktivitäten im Medium von Hefetransformanten, die das Referenzplasmid pADH040-2 enthalten (vgl. Tabelle II auf Seite 29).
Ein Vergleich der Enzymaktivitäten in Zellaufschlüssen und Medien der EK1 Transformanten zeigt, daß etwa 20 % der Enzymaktivität im Medium vorliegt, während bei den Hefetransformanten, die das Plasmid pGRT1-913 enthalten, im Kulturmedium 90% der ß-Lactamaseaktivität nachgewiesen wurden (vgl. Tabelle III auf Seite 29). Hefetransformanten, die das Referenzplasmid pADH040-2 enthalten, weisen im Kulturmedium nur 10% der Gesamtaktivität auf (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf). Die EK1 Transformanten zeigen demzufolge eine Verdopplung der Sekretionseffizienz gegenüber dem Referenzplasmid.

Eine zusätzliche Steigerung der Sekretionsrate zeigten die pHVOS14 Transformanten, wobei 40% der Gesamtaktivität im Medium nachgewiesen wurden. Im nächsten Abschnitt wird untersucht, ob dieser Befund mit immunologischen Nachweismethoden bestätigt werden kann.

Tabelle VIII: Ermittlung der ß-Lactamaseaktivität in Kulturmedien und Rohextrakten von EK1 Hefezellen transformiert mit den Plasmiden PHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26 angezogen auf 2% Raffinose

Transformanten	OD_{600nm}	Enzymaktivität			
		Rohextrakt		Medium	
		(mU)	(%)	(mU)	(%)
EK1 pHVOS6	1,9	32	86	5	14
	3,8	79	81	18	19
	6,0	97	81	22	19
	9,7	96	80	24	20
			(82±3)		(18±3)
EK1 pHVOS14	2,7	71	64	43	36
	4,4	87	50	87	50
	6,2	106	57	81	43
	7,7	109	64	61	36
			(59±7)		(41±7)
EK1 pHVOS18	2,0	70	88	10	12
	3,4	143	83	29	17
	5,2	223	80	56	20
	8,6	430	82	94	18
			(83±3)		(17±3)
EK1 pHVOS26	2,3	137	87	20	13
	3,4	202	76	63	24
	5,0	250	78	72	22
	6,8	263	77	80	23
			(80±5)		(20±5)

Die transformierten Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C auf YNB-Medium selektiv angezogen. 50 ml YEP-Medium mit 2% Raffinose wurde mit 2 ml Vorkultur angeimpft und bei 30 °C angezogen. In Zeitabständen wurden die ß-Lactamaseaktivitäten in den Überständen bestimmt. Für den Rohextrakt wurden jeweils 5 bzw. 10 ml Hefekultur abzentrifugiert und mit Glasperlen im Braun-Homogenisator aufgeschlossen. Die Ermittlung der Enzymaktivität und der Proteinkonzentration erfolgte nach Vorschrift (siehe Material und Methoden). Die Zahlenangaben beziehen sich auf 1 ml Rohextrakt bzw. Kulturmedium. Unter Prozent werden die Anteile der Gesamtaktivität angegeben, in Klammern die Mittelwerte.

3.3.10. Immunologischer Nachweis von Invertase-ß-Lactamase-fusionsproteinen im Medium transformierter Hefezellen nach Inkubation des Kulturmediums mit Endoglycosidase H

Die in den Überständen der EK1 Transformanten gemessene ß-Lactamaseaktivität konnte in den ersten immunologischen Untersuchungen des Kulturmediums mit ß-Lactamaseantikörpern nicht nachgewiesen werden. Da diese Proteine, aufgrund ihrer Invertasesequenz möglicherweise als hochglykosylierte Proteine ins Medium ausgeschleust werden, wurden Proben des Kulturmediums der EK1/pHVOS6 und EK1/pHVOS18 Transformanten mit dem Enzym Endoglycosidase H (EndoH) behandelt. Dieses Enzym spaltet den Zuckeranteil glykosylierter Proteine ab, sodaß nur die N-Acetylmuraminsäurereste am Protein verbleiben (Trimble und Maley, 1984). Das Ergebnis der immunologischen Untersuchung nach EndoH-Behandlung zeigt Abbildung 15.

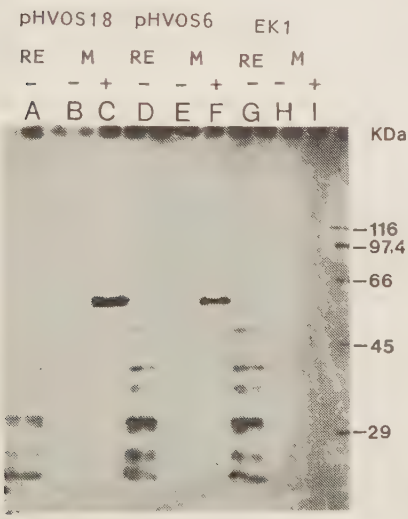


Abb. 15: Immunologische Untersuchung des Kulturmediums der EK1/pHVOS6 und EK1/pHVOS18 Transformanten mit und ohne EndoH

EK1 Transformanten wurden auf YEP-Medium mit 2% Raffinose über Nacht angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, und jeweils 200 µl der Überstände mit einem Volumen Citratpuffer (pH 5,5) über Nacht mit 0,003 mU EndoH bei 37 °C inkubiert. In gleicher Weise wurden Überstandsproben ohne EndoH inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit TCA gefällt (siehe Material und Methoden). Das Hefepellet wurde im Braun-Homogenisator aufgeschlossen (siehe Material und Methoden). Die Proben wurden in 20 µl Denaturierungsprobenpuffer nach Laemmli aufgenommen, über ein 12,5%iges SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert. Zur Kontrolle wurde EK1 Rohextrakt und Medium mit aufgetragen. RE = Rohextrakt; M = Medium; + (mit EndoH); - (ohne EndoH):
A) 10 µl Rohextrakt EK1/pHVOS18; B und C) 200 µl Medium EK1/pHVOS18 ohne und mit EndoH; D) 10 µl Rohextakt EK1/pHVOS6; E und F) 200 µl Medium EK1/pHVOS6 ohre und mit EndoH; G) 10 µl Rohextrakt EK1 untransformiert; H und I) 200 µl Medium EK1 untransformiert ohne und mit EndoH

Nach Inkubation des Kulturmediums mit EndoH können immunologisch Proteine im Medium der EK1/pHVOS6 und EK1/pHVOS18 Transformanten nachgewiesen werden (Abb. 15, Gelposition C und F), die mit ß-Lactamaseantikörper reagieren. Die Proteine besitzen beide ein Molekulargewicht von 64700 (±4%) Dalton (die in Klammern angebene Standardabweichung in Prozent wurde aufgrund der Daten der SDS-PA-Gele in Abb. 15, 16 und 17 errechnet). Ohne EndoH-Behandlung sind diese Proteine immunologisch nicht nachweisbar (Abb. 15, Gelposition B und E). Das Kulturmedium der untransformierten EK1 Hefezellen zeigt mit und ohne EndoH Behandlung keine Proteinbande, die mit dem ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert (Abb. 15, Gelposition H und I). Das Ergebnis kann nur so erklärt werden, daß im Medium der EK1/pHVOS6 und EK1/pHVOS18 Transformanten hochglykosylierte Fusionsproteine vorliegen müssen, die erst nach Abspaltung der

Zuckerseitenketten mit dem hier verwendeten Antikörper gegen ß-Lactamase reagieren (vgl. auch die Ergebnisse im Abschnitt 3.5.). Deshalb wurde bei den folgenden Untersuchungen das Kulturmedium stets mit EndoH über Nacht inkubiert.
Die Rohextrakte der transformierten und untransformierten EK1 Hefezellen zeigen unspezifische Bindungsreaktionen (Abb. 15, Gelposition A, D und G). Der verwendete ß-Lactamaseantikörper zeigte nach mehrmaligem Gebrauch häufig diese unspezifischen Reaktionen mit Rohextraktproben. Die Überstandsproben wiesen keine unspezifischen Reaktionen auf, und die Fusionsproteine der ß-Lactamase ließen sich mit Hilfe des Antikörpers im Medium eindeutig nachweisen.

EK1 Hefetransformanten, mit den Plasmiden pHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26, wurden über Nacht unter dereprimierten Bedingungen auf YEP-Medium mit 2 % Raffinose bis zu einer OD_{600nm} von 7 angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit Hilfe von Glasperlen im Braun-Homogenisator aufgeschlossen. 350 µl des Kulturmediums wurden in Gegenwart von EndoH über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden über ein SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit ß-Lactamaseantikörper hybridisiert. Das Ergebnis der immunologischen Untersuchung zeigt Abbildung 16.

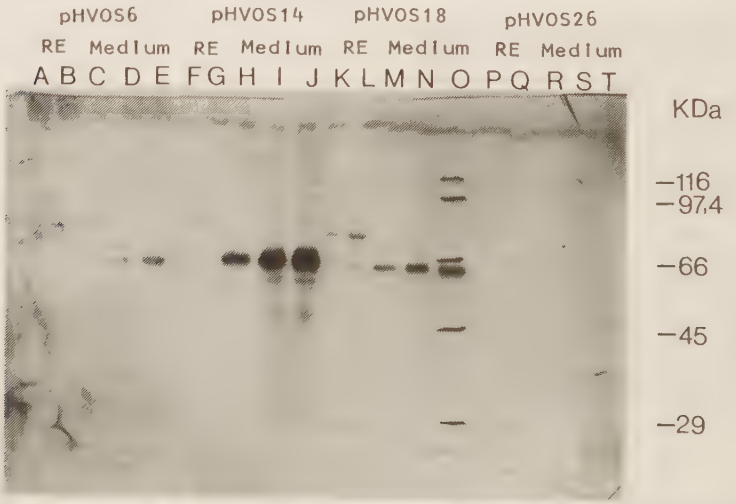


Abb. 16: Immunologische Untersuchung des Kulturmediums der EK1 Hefetransformanten nach Inkubation mit EndoH

EK1 Transformanten wurden auf YEP-Medium mit 2% Raffinose über Nacht angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, und jeweils 350 ul der Überstände mit einem Volumen Citratpuffer (pH 5,5) über Nacht mit 0,001 mU EndoH bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit TCA gefällt (siehe Material und Methoden). Das in 20 µl Hefepellet wurde im Braun-Homogenisator aufgeschlossen (siehe Material und Methoden). Die Proben wurden im Denaturierungsprobenpuffer nach Laemmli aufgenommen, über ein 10%iges SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert. RE = Rohextrakt:
A und B) 10 und 20 µl Rohextrakt EK1/pHVOS6; C bis E) 50, 100, und 200 µl Überstand EK1/pHVOS6; F und G) 10 und 20 µl Rohextrakt EK1/pHVOS14; H bis J) 50, 100, und 200 µl Überstand EK1/pHVOS14; K und L) 10 und 20 µl Rohextrakt EK1/pHVOS18; M und N) 50 und 100 µl Überstand EK1/pHVOS18; O) 200 µl Überstand EK1/pHVOS18 plus Proteinmarker; P und Q) 10 und 20 µlRohextrakt EK1/pHVOS26; R bis T) 50, 100 und 200 µl Überstand EK1/pHVOS26.

Die Kulturmedien der untersuchten EK1 Transformanten , zeigen unter dereprimierten Wachstumsbedingungen jeweils eine Proteinbande, die nach EndoH-Behandlung mit Antikörper gegen ß-Lactamase reagiert. Die Molekulargewichte der Proteine exprimiert in EK1/pHVOS6 und pHVOS18 betragen 64700 (±4%) Dalton (Abb. 16 Gelpositionen C, D, E, M, N und O). Etwas größer ist das Fusionsprotein, das in EK1/pHVOS14 Transformanten sezerniert wird. Das Protein besitzt eine Größe von 66500 (±2%) Dalton (Abb. 16, Gelpositionen H, I, J). Bedeutend kleiner ist das Fusionsprotein der EK1/ pHVOS26 Transformanten. Das Molekulargewicht dieser Proteinfusion beträgt im Medium nach EndoH-Behandlung 35500 (±3%) Dalton (Abb 16, Gelpositionen R, S und T). Die Molekulargewichte entsprechen den erwarteten Größen, die aufgrund der SUC2-Fragmente in den Konstruktionen pHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26 den Fusionsproteinen zugeordnet werden können. In den Rohextrakten (Abb 16, Gelpositionen A, B, F, G, K und L) können, mit Ausnahme der EK1/ pHVOS26 Proben (Abb. 16, Gelpositionen P und Q), Proteinbanden nachgewiesen werden, die mit ß-Lactamaseantikörpern reagieren. Die Molekulargewichte dieser Proteine sind in allen drei Fällen deutlich größer als die der Proteine im Medium der entsprechenden Fusionen nach EndoH Behandlung. Die Proteine der Fusionen pHVOS6 und pHVOS18 besitzen ein Molekulargewicht von 79600 (±3%) Dalton. Das Molekulargewicht des Proteins der Fusion pHVOS14 beträgt 81700 (±3%) Dalton (Die in Klammern angegebene Standarabweichung in Prozent wurden mit Hilfe der Molekulargewichtsdaten der SDS-PA-Gele der Abbildungen 16 und 17 ermittelt). Berechnet man die Differenzen zwischen den Molekulargewichten der Proteine in Kulturmedien zu denen in Rohextrakten, so ergibt sich für pHVOS6 und pHVOS18 ein Unterschied von 14900 Dalton und von pHVOS14 16200 Dalton. Offensichtlich liegen in den Zellaufschlüssen der EK1 Transformanten core-glykosylierte Vorstufen der ß-Lactamasefusionen vor, die mit dem ß-Lactamaseantikörper reagieren. Die Intensitäten der Proteinbanden sind in den drei Rohextraktproben etwa gleich stark ausgeprägt. Die Vorläufermoleküle werden offensichtlich in vergleichbaren Mengen in EK1 Transformanten exprimiert.

Die Kulturmedien der EK1 Transformanten weisen daraufhin, daß von diesen Transformanten unterschiedliche Proteinmengen ins Medium sezerniert werden. Die Abbildung 16 zeigt, daß die Intensität der Proteinbanden mit den aufgetragenen Volumina der Kulturüberstände korreliert.
Die Intensität der Proteinbande, die gegen ß-Lactamaseantikörper reagiert, ist bei den Überstandsproben der EK1/pHVOS6 und EK1/pHVOS18 Transformanten etwa gleich stark. Schwächer ist die Intensität der Proteinbande bei den EK1/pHVOS26 Proben. Ein besonders starkes Signal findet man bei den Überstandsproben der EK1/pHVOS14 Transformanten, obwohl diese Transformanten das core-glykosylierte Vorläufermolekül in etwa der gleichen Expressionsrate synthetisieren, wie die EK1/pHVOS18 und EK1/pHVOS6 Transformanten.
Die Rohextraktproben der EK1/pHVOS26 Transformanten zeigen nur schwache unspezifische Proteinbanden. Das Fusionsprotein der ß-Lactamase ist in der Probe des Mediums nur schwach erkennbar. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß die Kopienzahl der Konstruktion pHVOS26 in EK1 Transformanten niedriger ist als in den übrigen EK1 Zellen, die die Plasmide pHVOS6, 18 und 14

besitzen, oder daß das Fusionsgen der Fusion pHVOS26 schlechter exprimiert wird.
Die immunologischen Daten sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Aktivitätsbestimmungen der ß-Lactamase in Rohextrakten und Medien (vgl. Tabelle VIII). EK1/pHVOS14 Transformanten sezernieren mehr ß-Lactamasemoleküle als die EK1 Transformanten, die mit den Plasmiden pHVOS6, pHVOS18 und pHVOS26 transformiert sind.
Da nicht auszuschließen ist, daß die in EK1 Transformanten synthetisierten Fusionsproteine auch in der Zellwand vorliegen können, und/oder die unterschiedlichen Proteinmengen im Medium auf unterschiedliche Expressionsraten der entsprechenden Gene bzw. unterschiedliche Plasmidkopienzahlen zurückzuführen sind, wird im nächsten Abschnitt die Lokalisation der Fusionsproteine und das Verhältnis in den verschiedenen Fraktionen näher untersucht.

3.3.11. Immunologische und enzymatische Untersuchung der Lokalisation der Invertase-ß-Lactamasefusionsproteine in GRF18 Transformanten

GRF18 Hefezellen, transformiert mit pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26, wurden bis zur einer OD_{600nm} von 3 unter dereprimierten Anzuchtbedingungen auf 2 % Raffinose angezogen. 1,5 ml Zellkultur wurde in Gegenwart von Zymolyase protoplastiert (siehe Material und Methoden). Der Protoplastenüberstand (Zellwandfraktion) und das Protoplastenpellet (Cytoplasmafraktion) dienten als Ausgangsmaterial der enzymatischen und immunologischen Untersuchungen.

Für den immunologischen Nachweis wurden sowohl Cytoplasma- und Zellwandfraktion, sowie das Kulturmedium mit EndoH behandelt (siehe Material und Methoden) und in vergleichbaren Mengen auf einem 10%igen SDS-PA-Gel aufgetragen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 17.
In den Cytoplasmafraktionen der GRF18 Transformanten können Proteinbanden nachgewiesen werden, die mit ß-Lactamaseantikörpern reagieren (Abb. 17, Gelpositionen A, F und K). Das Molekulargewicht der Proteinfusion pHVOS26, das auf dem Gel nur schwach zu erkennen ist, beträgt etwa 40200 Dalton. Für die ß-Lactamasefusionen pHVOS14 und pHVOS18 konnten im Rahmen der Standarabweichung von ±3% die gleichen Daten errechnet werden wie für die ß-Lactamasefusionen in den Zellaufschlüssen der entsprechenden EK1 Transformanten (vgl. die Daten der Abb. 16). Nach EndoH-Behandlung nehmen die Molekulargewichte dieser Proteine ab, während die Intensitäten der Proteinbanden deutlich zunehmen (Abb. 17, Gelpositionen B, C und J). Die Fusionsproteine der Cytoplasmafraktionen besitzen nach EndoH-Behandlung die gleichen Molekulargewichte wie die Proteine der ß-Lactamasefusionen in den entsprechenden Kulturmedien. Auch hier sind die Daten der errechneten Molekulargewichte vergleichbar mit den Ergebnissen der Abbildung 16.
Zusammenfassend ergibt sich folgende Schlußfolgerung: die Fusionsproteine werden sowohl in EK1 als auch GRF18 Transformanten über core-glykosylierte Vorstufen synthetisiert. Diese Zwischenprodukte reagieren mit polyklonalen Antikörpern gegen ß-Lactamase (vgl. Abschnitt 3.3.12). Durch EndoH-Behandlung

werden die Zuckerreste abgespalten; die Molekulargewichte der Proteine nehmen ab. Gleichzeitig ist eine Zunahme der Bandenintensitäten der Fusionsproteine in den Cytoplasmafraktionen zu beobachten. Da pro Gelspur die Probenauftragsmengen von gleichen Zellmengen ausgehen, sind die Proben direkt ver-

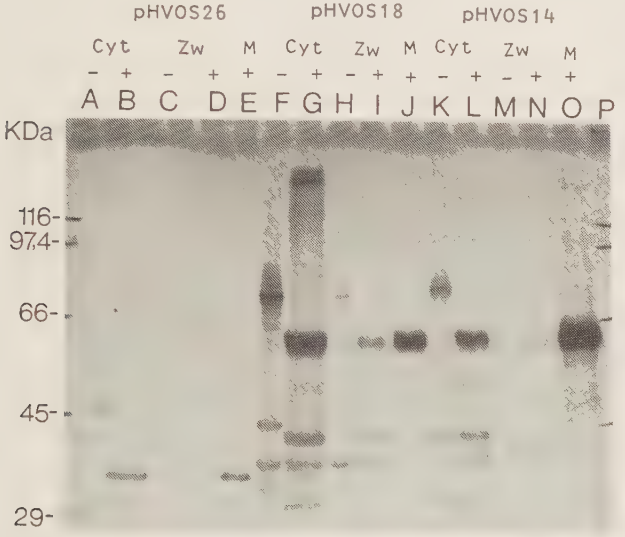


Abb. 17: Immunologische Untersuchung der Lokalisation der Invertase-ß-Lactamasehybridproteine in den GRF18 Transformanten

1,5 ml unter dereprimierten Wachstumsbedingungen angezogene GRF18 Transformanten wurden bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 3 protoplastiert. Die Protoplasten wurden osmotisch in 0,1 ml Tris-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,5) bei 0 °C aufgeschlossen. Der Protoplastenüberstand (Zellwandfraktion) und die Suspension der lysierten Protoplasten (Cytoplasmafraktion) wurden unter Zugabe von SDS bei einer Endkonzentration von 1% für 6 min bei 96 °C denaturiert. Je 20 µl der Proteinproben wurden in 1 ml 50 mM Citratpuffer (pH 5,5) mit 0,005 mU EndoH für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben unter Zugabe von TCA bei einer Endkonzentration von 10% gefällt, in 100 µl Denaturierungsouffer nach Laemmli aufgenommen und anschließend auf einem 10%igem SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit polyklonalen ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert. Cyt = Cytoplasma; Zw = Zellwand; M = Medium; + (mit EndoH); - (ohne EndoH): A) **GRF18/pHVOS26** 20 µl Cyt. ohne und B) mit EndoH, C) 20 µl Zellw. ohne und D) mit EndoH, E) 300 µl Medium mit EndoH; F) **GRF18/pHVOS18** 20 µl Cyt. ohne und G) mit EndoH, H) 20 µl Zellw. ohne und I) mit EndoH, J) 300 µl Medium mit EndoH; K) **GRF18/pHVOS14** 20 µl Cyt. ohne und L) mit EndoH, M) 20 µl Zellw. ohne und N) mit EndoH, O) 300 µl Medium mit EndoH; P)Proteinmarker

gleichbar. Die Zunahmen der Bandenintensitäten in den Cytoplasmafraktionen mit EndoH-Behandlung läßt darauf schließen, daß auch hochglykosylierte Fusionsproteine in den Zellen vorliegen müssen, die aber nicht mit dem ß-Lactamaseantikörper reagieren. Dieser Befund konnte bereits im Medium nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.3.10). Erst durch Inkubation der Cytoplasmafraktionen mit EndoH lassen sich diese Proteine immunologisch erfassen. Die Zunahme der Proteinbanden ist somit auf den Anteil hochglykosylierter Fusionsproteine der ß-Lactamase in den Cytoplasmafraktionen zurückzuführen. Aufgrund

der immunologischen Daten läßt sich grob abschätzen, daß in transformierten Hefezellen etwa 50% der Fusionsproteine in einer hochglykosylierten Form vorliegen müssen. Die Translokation dieser Proteine durch den Sekretionsweg der Hefe erfolgt mindestens bis zum Golgi-Komplex, da nur in diesem Organell die spezifische Modifikation der Seitenketten zur Hochglykosylierung stattfindet (Leblond und Bennett, 1977; Farquhar und Palade, 1981).
Damit stellt sich direkt die Frage, ob diese Fusionsproteine im Cytoplasma eventuell, wie die sekretorische Form der Invertase, in der Zellwand der Hefe lokalisiert sind.
Von den Zellwandfraktionen mit und ohne EndoH-Behandlung sind die Banden der ß-Lactamasefusionen gegenüber den Cytoplasmafraktionen nur schwach ausgebildet (Abb. 17, Gelpositionen C, D, H, I, M und N). In den Fraktionen ohne EndoH-Behandlung findet man die gleichen core-glykosylierten Proteinformen wie in den entsprechenden Cytoplasmafraktionen. Nach EndoH-Behandlung veringern sich die Molekulargewichte der Proteinbanden, und die Intensität nimmt zu, d.h. man findet das gleiche Ergebnis wie in den Cytoplasmafraktionen, nur mit dem Unterschied, daß die Proteinmengen niedriger sind als im Cytoplasma. Aufgrund dieser Beobachtung kann ausgeschlossen werden, daß der größte Anteil der glykosylierten Fusionsproteine in der Zellwand lokalisiert ist. Da auch core-glykosylierte ß-Lactamasefusionen in den Zellwandfraktionen nachweisbar sind (diese Form der Glykosylierung erfolgt ausschließlich im ER-Lumen), ist nicht auszuschließen, daß die Fusionsproteine der Zellwandfraktionen auf lysiertes Zellmaterial zurückzuführen sind. Durch enzymatische Messungen der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, einem cytoplasmatischen Protein, in den Cytoplasma- und Zellwandfraktionen wird diese Aussage zusätzlich bestätigt (siehe Seite 51).

Vergleicht man die Proteinbanden der Cytoplasmafraktionen mit denen der Kulturmedien, so zeigt sich, daß die bereits durch enzymatische Bestimmung erhaltenen Ergebnisse zur Lokalisation der ß-Lactamase (vgl. Tab. VIII) auch durch die immunologischen Daten bekräftigt werden. Eine überschlagsmäßige Quantifizierung der Bandenintensitäten der Cytoplasmafraktionen mit den entsprechenden Überstandsproben der Medien führt zu folfolgenden Ergebnissen. GRF18/pHVOS26 Transformanten zeigen etwa die gleiche Verteilung der ß-Lactamasefusion im Cytoplasma wie im Kulturmedium, d.h. bis zu 50% des synthetisierten Proteins wird sezerniert. Für GRF18/pHVOS18 Transformanten liegt eine Verteilung zu Gunsten der Cytoplasmafraktionen vor. Hier befindet sich etwa 2/3 des gesamten Proteins, d.h. nur etwa 33% der ß-Lactamase wird ausgeschleust. Bei den GRF18/pHVOS14 Transformanten befindet sich im Kulturmedium eine wesentlich kräftigere Bande, als in den Cytoplasmafraktionen. Diese Transformanten sezernieren etwa 70% des synthetisierten Fusionsproteins. Das Experiment beweist auch eindeutig, daß die höhere Proteinmenge im Kulturmedium der GRF18/pHVOS14 Transformanten nicht auf eine gesteigerte Expressionsrate und/oder auf eine höhere Kopienzahl des Plasmids pHVOS14 zurückzuführen ist. Vergleicht man die Proteinbanden der Cytoplasmafraktionen der GRF18/pHVOS18 und GRF18/pHVOS14 Transformanten miteinander, so ist diese Proteinbande in den GRF18/pHVOS18 Transformanten sogar stärker ausgebildet.

Auch die immunologischen Daten weisen darauf hin, daß die ß-Lactamasefusion der Konstruktion pHVOS14 besser sezerniert wird, als die übrigen Fusionsproteine. Die Angaben der Sekretionseffizienzen in Prozent, ermittelt durch enzymatische und immunologische Quantifizierung, weichen um etwa 20 bis 30% voneinander ab. Ursache hierfür sind möglicherweise unterschiedliche spezifische ß-Lactamaseaktivitäten der core-glykosylierten Vorstufen und hochglykosylierten ß-Lactamasefusionen. Hierauf wird in der Diskussion näher eingegangen (vgl. Abschnitt 4.2). Die Proteinbanden der ß-Lactamasefusion in GRF18/pHVOS26 Transformanten, waren auch bei diesem Versuch, wie bereits beim Vorversuch mit EK1/pHVOS26 Transformanten, nur schwach zu erkennen. Die Kopienzahl und/oder Genexpressionsraten der Konstruktion pHVOS26 scheinen generell niedriger zu sein, als bei den übrigen Plasmiden.

Die bereits bei der immunologischen Untersuchung verwendeten Fraktionsproben wurden auch für eine enzymatische Lokalisation der ß-Lactamase verwendet. Als Referenzenzym für cytoplasmatische Proteine diente Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6P-DH) EC 1.1.1.49. Mit Hilfe dieses Enzyms läßt sich der cytoplasmatische Anteil in der Zellwandfraktion, hervorgerufen durch lysiertes Zellmaterial, leicht bestimmen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle IX aufgeführt.

Tabelle IX: Bestimmung der Enzymaktivität der ß-Lactamase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase im Cytoplasma, Zellwand und Medium in GRF18 Transformanten

Plasmid	OD_{600nm}	Cytoplasma		Zellwand		Medium
		ß-Lactamase (ΔA/min)	G-6-PDH (ΔA/min)	ß-Lactamase (ΔA/min)	G-6-PDH (ΔA/min)	ß-Lactamase (ΔA/min)
pHVOS26	2,8	1,2 (74%)	15,4 (93%)	0,08 (5%)	1,2 (7%)	0,33 (21%)
pHVOS6	2,7	2,2 (69%)	16,4 (97%)	0,33 (10%)	0,5 (3%)	0,69 (21%)
pHVOS18	3,0	2,8 (63%)	11,6 (89%)	0,49 (11%)	1,4 (11%)	1,12 (26%)
pHVOS14	2,9	0,6 (35%)	15,4 (93%)	0,14 (8%)	1,2 (7%)	0,98 (57%)

GRF18 Transformanten wurden unter dereprimierten Anzuchtbedingungen auf 2% Raffinose YEP-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 3 angezogen. 1,5 ml der Hefekulturen wurden abzentrifugiert, in 1,2 M Sorbitol gewaschen und in 100 µl Zymolyasepuffer protoplastiert (Siehe Material und Methoden). Der ProtoplastenÜberstand wurde als Zellwandfraktion eingesetzt. Das Protoplastenpellet wurde in 100 µl Tris-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,5) osmotisch aufgeschlossen. Die Enzymmessungen erfolgten nach den im Material- und Methodenteil aufgeführten Vorschriften. Die Enzymwerte beziehen sich auf 1,5 ml Kulturprobe. Glucose-6-phosphatdehydrogenaseaktivität konnte im Medium nicht nachgewiesen werden. Die in Klammern angebenen Werte geben die Verhältnisse in Prozent an.

Bei der hier angewendeten Methode zur Protoplastierung von Hefezellen, lysieren etwa 5 bis 10 % der Zellen. Diese Werte wurden auch bei Lokalisationsstudien der Invertase ermittelt (Bielefeld, Dissertation in Vorbereitung). Aktivitätsmessungen der ß-Lactamase in den Zellwandfraktionen ergeben gleiche Werte. Auch hier liegt der Anteil bei 5 bis 10 % (vgl. Tabelle IX).
Die immunologischen und enzymatischen Lokalisationsstudien lassen die Schlußfolgerung zu, daß die Fusionsproteine der Plasmidkonstruktionen pHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26 nicht oder nur zu einem geringen Anteil in der Zellwand loka-

lisiert sind. Sie unterscheiden sich hierin deutlich von der Invertase. Die sekretorische Form der Invertase befindet sich in der Hefezellwand (Neumann et al., 1967; Sutton et al., 1962) Nur ein geringer Anteil von 1 bis 2 % befindet sich im Kulturmedium (Bielefeld, persönl. Mitteilung). Vorstufen der sekretorischen Invertase lassen sich nur mit Hilfe von "Pulse-chase"-Experimenten nachweisen (Schauer et al., 1985). Core-glykosylierte Vorläufermoleküle der Invertase-ß-Lactamasefusionen können jedoch immunologisch in Rohextrakten nachgewiesen werden (vgl. Rohextraktproben in Abb. 16, und Cytoplasmafraktionen ohne EndoH-Behandlung in Abb, 17); ein Hinweis dafür, das der Transfer dieser Proteine durch den Hefesekretionsweg wesentlich langsamer verlaufen muß. Offensichtlich befinden sich innerhalb der Zelle auch hochglykosylierte Fusionsproteine. Diese lassen sich jedoch nur nach EndoH-Behandlung immunologisch nachweisen (vgl. Zunahme der Proteinbande in der Cytoplasmafraktion nach EndoH-Behandlung Abb. 17). Hochglykosylierte Invertasemoleküle lassen sich hingegen in den Cytoplasmafraktionen nicht nachweisen, sondern nur in den Zellwandfraktionen (Bielefeld, Dissertation in Vorbereitung). Offensichtlich liegt auch zwischen dem Golgi-Komplex und dem Vorgang der Exocytose ein verlangsamter Transport der ß-Lactamasefusionen vor, nur so läßt sich das Vorhandensein hochglykosylierter Fusionsproteine in den Cytoplasmafraktionen erklären.

3.3.12. Nachweis des core-glykosylierten Zwischenprodukts der Invertase-ß-Lactamasefusion in EK1/pHVOS18 Transformanten

EK1/pHVOS18 Transformanten zeigen in Rohextrakten und in Kulturmedien die höchsten Enzymaktivitäten der Invertase-ß-Lactamasefusionen (siehe Tabelle VI und VII). Aufgrund dieser Tatsache wurden die Transformanten ausgewählt, um den Glykosylierungsgrad des Fusionsproteins zu untersuchen. Hierzu wurden die Hefetransformanten in Gegenwart des Antibiotikums Tunicamycin angezogen. Das Antibiotikum verhindert die Ausbildung der N-spezifischen Seitenkettenglykosylierung (Duskin und Mahoney, 1982). Das Ergebnis der immunologischen Untersuchung ist in Abbildung 18 auf Seite 53 gezeigt.

Innerhalb der Cytoplasmafraktion dereprimierter Hefetransformanten findet man ein Protein mit einem Molekulargewicht von 79600 (±3%) Dalton, das mit ß-Lactamaseantikörpern reagiert (Abb. 18, Gelposition D). In Hefetransformanten, die mit dem Antibiotikum Tunicamycin behandelt wurden, läßt sich ebenfalls eine Proteinbande nachweisen, die eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-PA-Gel besitzt. Das Molekulargewicht dieses Proteins beträgt etwa 64700 (± 4%) Dalton (Abb. 18, Gelposition E). Die Molekulargewichte sind vergleichbar mit den Proteinen in den Cytoplasmafraktionen mit und ohne EndoH-Behandlung der GRF18/pHVOS18 Transformanten (Abb. 17, Gelpositionen F und G) und liegen innerhalb der Standarabweichung von 3 bzw. 4 Prozent.
In Hefezellen, die unter reprimierten Bedingungen angezogen wurden, lassen sich keine Proteinbanden nachweisen, die mit dem polyklonalen ß-Lactamaseantikörper hybridisieren (Gelposition G und H, Abb. 18). Das Fusionsprotein unterliegt, wie bereits enzymatische Daten gezeigt haben (vgl. Tabelle VII),

der Glucose Repression/Derepression. Die konstitutive ß-Lactamasefusion ließ sich unter den gewählten Bedingungen nicht nachweisen.

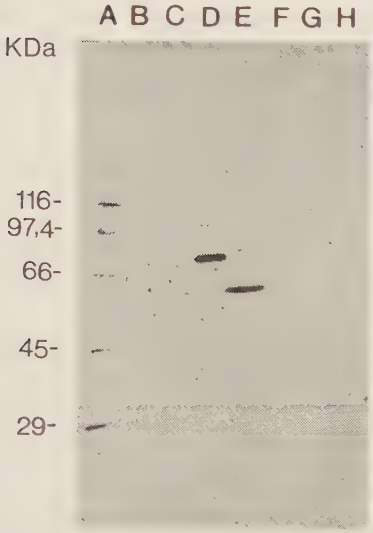


Abb. 18: Immunologische Untersuchung der ß-Lactamasefusion in EK1/pHVOS18 Transformanten unter Einwirkung des Antibiotikums Tunicamycin

Die Hefetransformanten wurden über Nacht in 50 ml YEP-Medium mit 5% Glucose bei 30 °C angezogen. Die Vorkultur wurde in sterilem H_2O gewaschen und in 5 ml sterilem H_2O aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend für acht Stunden unter reprimierten (YEP-Medium mit 5% Glucose) und dereprimierten (YEP-Medium mit 2% Raffinose) Anzuchtbedingungen inkubiert. Als Animpfmenge für 20 ml Hauptkultur wurden jeweils 250 µl Vorkultur eingesetzt. Eine zweite Hauptkultur wurde unter dereprimierten Bedingungen in Gegenwart von Tunicamycin (50 µg/ml) inkubiert.

Die Zellen wurden mit Zymolyase protoplastiert und fraktioniert (siehe Material und Methoden). Die Proben wurden über ein 12,5%iges SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert.

A) Proteinmarker
B) 1 ml Medium EK1/pHVOS18 (2% Raffinose)
C) 750 µl Zellwand " "
D) 25 µl Cytoplasma " "
E) 50 µl Cytoplasma " (Tunicamycin)
F) 1 ml Medium " (5% Glucose)
G) 750 µl Zellwand " "
H) 25 µl Cytoplasma " "

Das Kulturmedium zeigt auch bei einem Auftragsvolumen von einem Mililiter keine spezifische ß-Lactamasebande. Selbst core-glykosylierte Vorstufen, die mit dem ß-Lactamaseantikörper reagieren, sind im Medium nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt, daß die im Medium ermittelte ß-Lactamaseaktivität ausschließlich von ausgeschleusten hochglykosylierten Fusionsproteinen hervorgerufen wird und nicht aufgrund lysierter Zellen verursacht wird (vgl. Diskussionsabschnitt 4.2.).

Die Untersuchung bestätigt die bisherigen Ergebnisse:
Im Rohextrakt von dereprimierten EK1/pHVOS18 Transformanten ist ein glykosyliertes Fusionsprotein nachweisbar, das mit spezifischen Antikörpern gegen ß-Lactamase reagiert. Verhindert oder beseitigt man man die Glykosylierung durch Tunicamycin oder EndoH, so liegt ein Fusionsprotein in den Zellen vor, das ein deutlich kleineres Molekulargewicht aufweist. Der Invertaseteil (750 Bp = 250 As) mit seinen sechs potentiellen Glykosylierungssequenzen wird während des Sekretionsprozesses glykosyliert. Dies gilt auch für die übrigen Invertase-ß-Lactamasefusionen. Die Fusionsproteine sind demzufolge sekretorische Proteine, die unterschiedliche Sekretionseffizienzen aufweisen.

3.4. Integration der Alpha-Prosequenz innerhalb eines Invertase-ß-Lactamase Hybridproteins führt zur Sekretion enzymatisch aktiver ß-Lactamase

Mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors konnte eine Sekretion der ß-Lactamase in Hefetransformanten nachgewiesen werden; 90% der ß-Lactamaseaktivität wurde im Medium gemessen (vgl. Tab. III auf Seite 29).
N-terminale Aminosäuresequenzen der sekretorischen Invertase, im Austausch gegen die prokaryotische ß-Lactamasesignalsequenz, führten ebenfalls zum Auschleusen der Fusionsprodukte. Die Enzymaktivitäten im Medium waren jedoch sehr niedrig, und nur maximal 40% der ß-Lactamaseaktivität konnte im Kulturmedium nachgewiesen werden.
Aufgrund dieser Daten bestand das Interesse der Frage nachzugehen, ob eine Integration der Prosequenz des Alpha-Faktors in eine Invertase-ß-Lactamasefusion eine Steigerung der Sekretionseffizienz zur Folge hat.
Die Presequenz (22 Aminosäuren) des Alpha-Faktors entspricht aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften den Signalsequenzen sekretorischer Proteine. Dies zeigt auch die Homologiestudie mit der Presequenz des Prepromelittins. Beide Sequenzen sind weitgehend homolog (Julius et al., 1984a). Im Gegensatz zu den Signalsequenzen anderer sekretorischer Proteine wird die Presequenz des Alpha-Faktors nicht cotranslational abgespalten (Julius et al., 1984b). Die Funktion der Prosequenz, mit ihren drei potentiellen Glykosylierungsstellen, konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden. Sicher ist, daß sie Prozessierungsstellen aufweist, die für die Reifung des Alpha-Faktors zum biologisch aktiven Pheromon notwendig sind (Julius et al., 1983, 1984 a,b). Es wurde auch postuliert, daß die Prosequenz für die Sekretion des Alpha-Faktors erforderlich ist (Bitter et al., 1984).

3.4.1. Das Plasmid pGRT2-6310
Ein Hefevektor mit integrierter Alpha-Prosequenz innerhalb eines Invertase-ß-Lactamase Fusionsgens

Die Plasmidkonstruktion ging von Plasmiden mit Deletionen innerhalb des Invertasegens aus (siehe Abschnitt 3.3.3.). Nach der Auffüllreaktion der linearisierten Plasmide mit Nukleotiden, wurden die Plasmide in Gegenwart von PstI-Linkern ligiert. Aus E.coli Transformanten konnte das Plasmid pINV325-4 isoliert werden (siehe Abb. 20). Das Plasmid besitzt die über PstI-Linkereinbau erzielte Schnittstelle innerhalb des Invertasegens 609 Bp vom Translationsstartpunkt entfernt. Die genaue Position der PstI-Schnittstelle konnte durch Sequenzierung ermittelt werden (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf). Nach Verdauung des Plasmids mit dem Restriktionsenzym PstI und anschließender Religation konnte aus E.coli Transformanten des Phänotyps Tc^R, Amp^S die Plasmidkonstruktion pINV325-41 isoliert werden. In dieser Konstruktion ist der 5'Genbereich der Invertase über die PstI-Schnittstelle mit dem 3'Genbereich der ß-Lactamase fusioniert (Siehe Abbildung 20). Durch Einbau des 725 Bp DNA-Fragments aus pGRT1-913, das sowohl die Alpha-Pro-Sequenz als auch den 5'Genbereich der ß-Lactamase trägt, wurde das ß-Lactamasegen über die PstI-Schnittstelle wieder rekonstruiert.

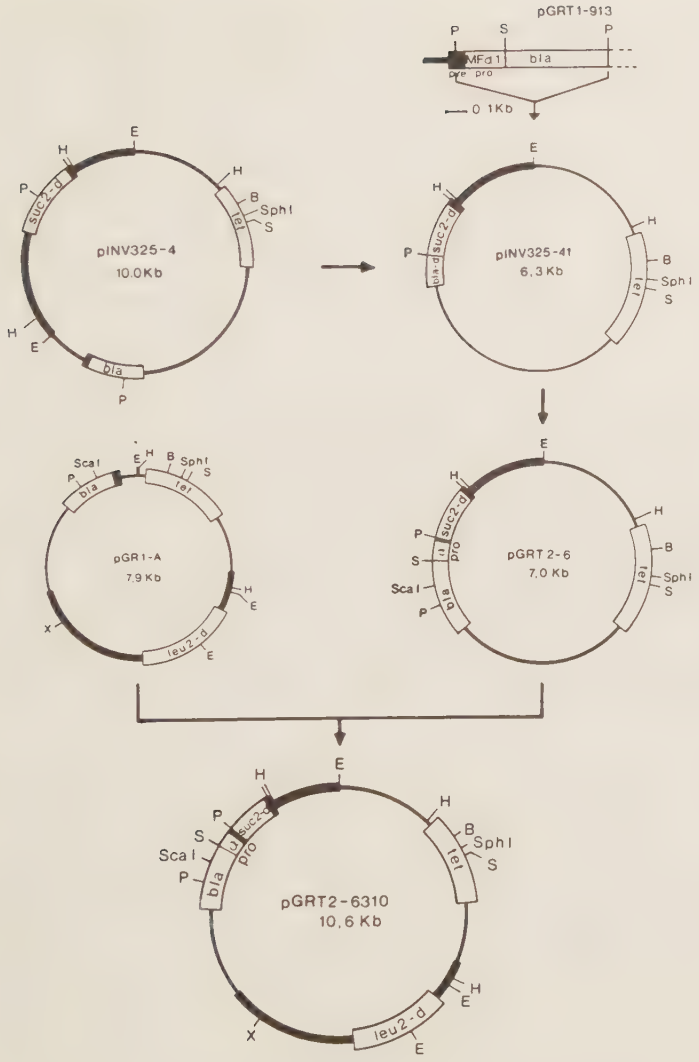


Abb. 20: Konstruktionsschema des Plasmids pGRT2-6310

Das Plasmid pINV325-4 wurde mit dem Restriktionsenzym PstI verdaut und anschließend religiert. Das Zwischenprodukt pINV325-41 besitzt ein deletiertes Ampicillinresistenzgen. Durch Einbau des 725 Bp DNA-Fragmentes aus pGRT1-913 in die PstI-Schnittstelle des Plasmids pINV325-41 erfolgte die Rekonstruktion des Resistenzgens gegen Ampicillin; gleichzeitig wurde der 5'Invertasegenbereich über die PstI-Schnittstelle mit einem Teil der Alpha-Presequenz fusioniert. Das Zwischenprodukt pGRT2-6 wurde durch einen Fragmentaustausch über die Restriktionsschnittstellen ScaI und SphI mit pGR1-A in einen Hefevektor umgewandelt. Die Plasmidkonstruktion erhielt die Bezeichnung pGRT2-6310. B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII, S = SalI, P = PstI und X = XbaI. Dicke Linie: S.cerevisiae DNA; dünne Linie: pBR322 bzw. pBR325; schwarzer Balken: Signal- bzw. Presequenzen.

Gleichzeitig wurde der 5'Invertasegenbereich über die PstI-Schnittstelle mit einem Teil der Alpha-Presequenz fusioniert. Das Zwischenprodukt erhielt die Bezeichnung pGRT2-6. E.coli Zellen, die mit diesem Plasmid transformiert wurden, wiesen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin bis zu einer Konzentration von 150 µg/ml auf. Da innerhalb der Preprosequenz des Alpha-Faktors kein ATG-Codon vorliegt, ließ dieses Ergebnis auf ein intaktes Leseraster innerhalb der Invertase-Prepro-Fusion und auf die Expression eines Fusionsproteins schließen (vgl. die Ergebnisse in Abschnitt 3.3.6. auf Seite 40). Das intakte Leseraster innerhalb der Fusion konnte durch eine spätere Sequenzierung des Fusionsbereiches bestätigt werden (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf). Ein Fragmentaustausch über die Restriktionsschnittstellen ScaI und SphI des Zwischenprodukts pGRT2-6 mit pGR1-A führte zum Hefevektor pGRT2-6310. Ein Konstruktionsschema ist in Abbildung 20 dargestellt.

3.4.2. Sekretion von ß-Lactamase in pGRT2-6310 transformierten Hefezellen erfolgt unabhängig vom Paarungstyp und unterliegt der Glucose Regulation

Die Hefestämme GRF18 (α) und AH22 (a) wurden mit dem Plasmid pGRT2-6310 transformiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte auf Komplettmedium (YEP) mit 2% Raffinose bzw. 5% Glucose bei 30 °C. Die Zunahme der ß-Lactamaseaktivität im Kulturmedium wurde mit Hilfe der Nitrocefinmessung durchgeführt. Zum Vergleich wurde die Zunahme der ß-Lactamaseaktivität im Kulturmedium von GRF18-Transformanten, die das Plasmid pGRT1-913 besitzen und auf 2% Raffinose angezogen wurden, untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle X und XI zusammengefaßt.

Tabelle X: Bestimmung der ß-Lactamaseaktivität im Kulturmedium von Hefetransformanten, die das Plasmid pGRT2-6310 bzw. pGRT1-913 enthalten, angezogen auf 2% Raffinose

GRF18/pGRT2-6310		AH22/pGRT2-6310		GRF18/pGRT1-913	
OD_{600nm}	Enzym-aktivität (mU/ml)	OD_{600nm}	Enzym-aktivität (mU/ml)	OD_{600nm}	Enzym-aktivität (mU/ml)
1,0	20	1,0	18	1,2	163
1,5	79	1,6	101	-	-
1,7	103	2,2	208	2,8	1666
2,9	232	4,1	366	-	-
4,1	360	5,8	613	-	-
7,0	437	9,5	661	9,4	7072

Die transformierten Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C auf YNB-Medium selektiv angezogen. 5 ml der Übernachtkulturen wurden in 10 ml sterilem H_2O gewaschen. Die Animpfmenge in 50 ml YEP-Medium mit 2% Raffinose betrug 0,5 ml. Die Inkubation der Hauptkulturen erfolgte bei 30 °C. In Zeitabständen wurden Proben des Kulturmediums entnommen, die Zellen abzentrifugiert, und die ß-Lactamaseaktivität bestimmt. 1 mU ist die Enzymaktivität, die bei 30 °C 1 nmol 2-Chlor-4-Nitrophenol pro min freisetzt.

Tabelle XI: **Bestimmung der ß-Lactamaseaktivität im Kulturmedium und Rohextrakten von GRF18/pGRT2-6310 Transformanten angezogen unter reprimierten und dereprimierten Bedingungen**

Dereprimiert					Reprimiert				
	Überstand		Rohextr.			Überstand		Rohextr.	
OD_{600nm}	(mU)	(%)	(mU)	(%)	OD_{600nm}	(mU)	(%)	(mU)	(%)
3,8	140	53	124	47	-	-	-	-	-
6,8	328	55	272	45	5,7	0	0	14	100
10,1	450	60	299	40	10,4	0	0	56	100
		(56±4)		(44±4)			(0)		(100)

Die Hefetransformanten wurden auf YEP-Medium mit 2 % Raffinose (dereprimiert) und 5% Glucose (reprimiert) bei 30 °C inkubiert. Für den Rohextrakt wurden jeweils 5 ml Hefekultur abzentrifugiert und mit Glasperlen im Braun-Homogenisator aufgeschlossen (siehe Material und Methoden). Die Zahlenangaben beziehen sich jeweils auf 1 ml Kulturmedium bzw. Rohextrakt. Die in Klammern angegebenen Werte geben die Mittelwerte in Prozent an.

Die mit dem Hefevektor pGRT2-6310 transformierten Hefezellen sezernieren aktive ß-Lactamase. Die Synthese und Sekretion des Proteins erfolgt, im Gegensatz zu pGRT1-913 Transformanten, unabhängig vom Paarungstyp sowohl in a als auch in α Zellen. Die Enzymaktivität im Medium ist jedoch während der gesamten Wachstumsphase etwa 10-fach niedriger als im Kulturmedium von GRF18/pGRT1-913 Transformanten (vgl. die Werte in der Tabelle X). Aus der Untersuchung der Enzymaktivitäten im Kulturmedium und Rohextrakten von pGRT2-6310 Transformanten, angezogen auf 2% Raffinose bzw. 5% Glucose (vgl. Tabelle XI), wird deutlich, daß die Genexpression der ß-Lactamase in der Plasmidkonstruktion pGRT2-6310 der Glucose-Repression/Derepression unterliegt. Im Kulturmedium von Hefetransformanten, die unter reprimierten Anzuchtbedingungen wuchsen, konnte keine ß-Lactamaseaktivität nachgewiesen werden. Die Genfusion unterliegt der Kontrolle des Invertasepromotors.
Die Enzymaktivität der ß-Lactamase im Medium beträgt etwa 55 % gegenüber der Gesamtaktivität. Die Sekretionseffizienz ist niedriger als bei der Alpha-Faktor-ß-Lactamasefusion, kodiert durch pGRT1-913, übertrifft aber die Werte, die bei den Invertase-ß-Lactamasefusionen gemessen wurden. Die ß-Lactamaseaktivitäten im Kulturmedium der GRF18/pGRT2-6310 Transformanten sind vier- bis sechsfach höher als die Werte, die im Medium der Invertase-ß-Lactamasefusionen gemessen werden konnten (vgl. Tabelle VIII, auf Seite 44).
Die Integration des 725 Bp DNA-Fragmentes, mit der kodierenden Region der Pro- und 2/3 Presequenz des Alpha-Faktors in eine Invertase-ß-Lactamasegenfusion, führt zum Export aktiver ß-Lactamasemoleküle. Im folgenden Abschnitt wird durch immunologischen Nachweis untersucht, ob die Prozessierungsstelle der Prosequenz auch in der pGRT2-6310 Fusion erkannt wird.

3.4.3. Immunologischer Nachweis der ß-Lactamase in Kulturmedien bzw. Rohextrakten in GRF18/pGRT1-913 und GRF18/pGRT2-6310 Transformanten

Der Hefestamm GRF18 transformiert mit den Plasmiden pGRT1-913 bzw. pGRT2-6310 wurde auf YEP-Medium mit 2% Raffinose bzw. 5% Glucose angezogen. Die Kulturmedien und Rohextrakte der Transformanten wurden immunologisch untersucht. Das Ergebnis der immunologischen Untersuchung zeigt Abbildung 21.

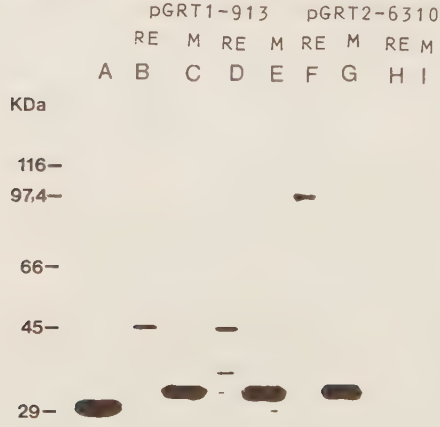


Abb. 21: Immunologische Untersuchung der Kulturmedien und Rohextrakte von GRF18 transformiert mit pGRT1-913 und pGRT2-6310
GRF18 Transformanten wurden über Nacht auf YEP-Medium mit 2% Raffinose bzw. 5% Glucose bei 30 °C inkubiert. Je 5 ml Hefekultur wurde entnommen, die Zellen abzentrifugiert und das Pellet im Braun-Homogenisator mit Glasperlen aufgeschlossen (siehe Material und Methode). Eingesetzt wurden jeweils 10 µl Rohextrakte. Die Überstände der abzentrifugierten Zellen wurden mit 50%iger TCA gefällt und in 100 µl Denaturierungspuffer nach Laemmli aufgenommen. Die Proben wurden über ein 12,5%iges SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert.
A) Proteinmarker; B) authentische ß-Lactamase; C) 10 µl Rohextr. pGRT1-913 (2% Raffinose); D) 1 ml Medium pGRT1-913 (2% Raffinose); E) 10 µl Rohextr. pGRT1-913 (5% Glucose); F) 1 ml Medium pGRT1-913 (5% Glucose); G) 10 µl Rohextr. pGRT2- 6310 (2% Raffinose); H) 5 ml Medium pGRT2-6310 (2% Raffinose); I) 10 µl Rohextr. pGRT2-6310 (5% Glucose); J) 5 ml Überstand pGRT2-6310 (5% Glucose)

Die Kulturmedien des Hefestammes GRF18 transformiert mit den Plasmiden pGRT1-913 bzw. pGRT2-6310 zeigen auf einem SDS-PA-Gel jeweils eine Proteinbande, die mit Antikörpern gegen ß-Lactamase reagiert (Abb. 21, Gelpositionen D, F und H). Die Proteine besitzen identische Wanderungsgeschwindigkeiten im SDS-PA-Gel. Die Expression des vom Plasmid pGRT1-913 kodierten Proteins erfolgt in GRF18 Transformanten sowohl auf 2% Raffinose als auch auf 5% Glucose (Abb. 21, Gelpositionen C und E). Im Gegensatz hierzu exprimieren GRF18 Zellen, die das Plasmid pGRT2-6310 enthalten, das Protein nur auf 2% Raffinose (Abb. 21, Gelpositionen G und I).
Die immunologische Untersuchung des Rohextraktes von GRF18/pGRT1-913 Transformanten wurde bereits beschrieben (vgl. Abschnitt 3.2.5. auf den Seiten 30-32). Auch bei diesem Experiment sind die gleichen Vorläufermoleküle im Rohextrakt nachweisbar. Der Rohextrakt der GRF18 Hefezellen, transformiert mit dem Plasmid pGRT2-6310, zeigt unter dereprimierten Anzuchtbedingungen auf einem SDS-PA-Gel nur eine Proteinbande als Vorläufermolekül, die mit Antikörpern gegen ß-Lactamase reagiert. Das Molekulargewicht dieses Proteins beträgt etwa 88800 (±3%) Dalton (Abb. 21 Gelposition G). Die in Klammern angegebene Standardabweichung in Prozent wurde aufgrund von SDS-PA-Gelen ermittelt, auf denen Rohextraktproben von GRF18/pGRT2-6310 Transformanten aufgetragen wurden. Rohextrakte von GRF18/pGRT2-6310 Transformanten zeigten nach EndoH-

Behandlung eine Vorstufe der ß-Lactamasefusion mit einem Molekulargewicht von etwa 75000 Dalton (vgl. Abb. 23, Gelpositionen c und d). Die Differenz beträgt 13800 Dalton. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Proteinfusion der ß-Lactamase in der Konstruktion als core-glykosylierte Vorstufe synthetisiert wird. Auf dem Invertasefragment und der Prosequenz befinden sich insgesamt neun potentielle Glykosylierungsstellen. Die Synthesevorstufe des Hybridproteins wird innerhalb der Zelle in die reife enzymatisch aktive ß-Lactamase umgewandelt. Nur das prozessierte Protein läßt sich im Medium immunologisch nachweisen.

Im folgenden Abschnitt werden Rohextrakt- und Überstandsproben von GRF18 Transformanten mit den Plasmiden pGRT1-913, pGRT2-6310 und pHVOS18 miteinander verglichen. Diese Hefetransformanten sezernieren die ß-Lactamase unterschiedlich gut, wie Vergleiche der ß-Lactamaseaktivitäten in Rohextrakten und Medien gezeigt haben. Durch immunologische Untersuchungen soll nachgewiesen werden, ob die Ergebnisse der Enzymaktivitäten auch auf Proteinebene bestätigt werden.

3.4.4. Untersuchung der ß-Lactamaseproteine in Rohextrakten und Kulturmedien von GRF18 Transformanten, transformiert mit den Plasmiden pGRT1-913, pGRT2-6310 und pHVOS18

GRF18 Transformanten wurden auf YEP-Medium mit 2 % Raffinose über Nacht bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 7 angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, und Aliquots des Mediums auf einem 10%igem SDS-PA-Gel aufgetragen und mit ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert. Das Ergebnis zeigt Abb. 22.

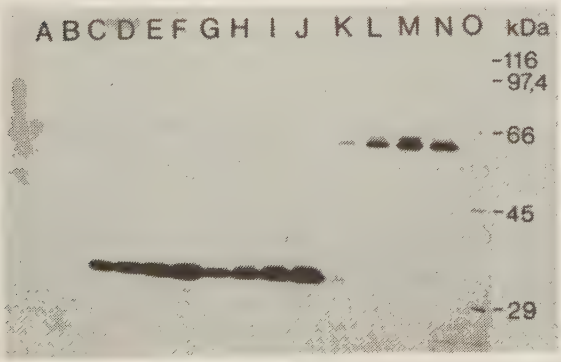


Abb. 22: Vergleichende Untersuchung der Kulturmedien von GRF18 Hefezellen, transformiert mit den Plasmiden pGRT1-913, pGRT2-6310 und pHVOS18

GRF18 Transformanten wurden über Nacht auf YEP-Medium mit 2 % Raffinose bei 30 °C inkubiert. Aliquots wurden aus den Kulturen entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Die Überstandsproben der GRF18/pHVOS18 wurden über Nacht bei 37 °C mit EndoH inkubiert (siehe Material und Methoden). Die Überstände wurden mit TCA gefällt (siehe Material und Methoden) und in 50 µl Denaturierungsprobenpuffer nach Laemmli aufgenommen. Die Proben wurden über ein 10%iges SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit ß-Lactamase-antikörpern hybridisiert. Zur Kontrolle wurde der Überstand von untransformierten Zellen mit aufgetragen.
A-B) 200, 400 µl GRF18 untransformiert; C-F) 5, 10, 20, 40 µl GRF18/pGRT1-913; G-J) 50, 100, 200, 400 µl GRF18/pGRT6310; K-N) 50, 100, 200, 400 µl GRF18/pHVOS18; O) Proteinmarker

Aufgrund der immunologischen Daten der Abbildungen 21 und 22 kann angenommen werden, daß im Medium von GRF18/pGRT1-913 und GRF18/pGRT2-6310 Transformanten identisch prozessierte ß-Lactamasemoleküle vorliegen. Die spezifischen Enzymaktivitäten der Proteine sollten demnach gleich sein. Die ß-Lactamaseaktivität im Medium der GRF18/ pGRT2-6310 Transformanten war 10-fach niedriger als die Aktivität im Medium der GRF18/pGRT1-913 Transformanten (vgl. Tabelle X). Die immunologische Untersuchung dieser Medien zeigt, daß bei einer 10-fach größeren Auftragsmenge die Proteinbanden der beiden Fusionen etwa gleich stark ausgebildet sind (vgl. Abb. 22, Gelpositionen C bis J). Dieses Ergebnis konnte auch durch ein mit Coomassie-Blue angefärbtes SDS-PA-Gel bestätigt werden (siehe unten). Die Daten bekräftigen die Aussage, daß die von den Plasmiden pGRT1-913 und pGRT2-6310 kodierten ß-Lactamasefusionen im Medium identische Proteine sind, die gleiche spezifische Enzymaktivitäten besitzen. GRF18/pGRT2-6310 Transformanten sezernieren demnach etwa zehnmal weniger ß-Lactamasemoleküle. Dieser Befund kann zum einen erklärt werden durch unterschiedliche Promotorenstärke, verbunden mit einer niedrigeren Expressionsrate, zum anderen aber auch durch verlangsamte Sekretion, wie durch Vergleichsstudien der ß-Lactamaseaktivitäten in Rohextrakten und Medien nachgewiesen wurden (vgl. Diskussion 4.3.).

In den Konstruktionen pGRT2-6310 und pHVOS18 unterliegen beide Fusionsgene der Kontrolle des Invertasepromotors. Die Expressionsrate der Gene sollte gleich sein. In den Medien der GRF18/pHVOS18 Transformanten ist die gemessene Enzymaktivität bis zu zehnmal niedriger als in GRF18/pGRT2-6310 Transformanten. Wie gezeigt werden konnte, liegen in den Medien dieser beiden Transformanten unterschiedliche ß-Lactamasemoleküle vor. Während die GRF18/pGRT2-6310 Transformanten prozessierte ß-Lactamase ausschleusen, befindet sich im Medium der GRF18/pHVOS18 Transformanten ein hochmolekulares, glykosyliertes Fusionsprotein, das nur nach EndoH-Behandlung immunologisch nachgewiesen werden kann. Es ist daher anzunehmen, daß die beiden ß-Lactamaseproteine unterschiedliche spezifische Aktivitäten aufweisen. Die niedrige ß-Lactamaseaktivität im Medium der GRF18/pHVOS18 Transformanten könnte hierdurch erklärt werden (vgl. auch Diskussion 4.2). Die immunologische Untersuchung der beiden Medien zeigt aber, daß im Medium der GRF18/pHVOS18 Transformanten tatsächlich weniger ß-Lactamaseproteine vorliegen (vgl. Abb. 22, Gelpositionen G bis N). Dieser Befund konnte ebenfalls auf einem mit Coomassie-Blue angefärbten SDS-PA-Gel gezeigt werden (siehe unten). Da jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, daß unterschiedliche Expressionsraten bzw. Plasmidkopienzahlen in den beiden Transformanten vorliegen, wurde das Experiment wiederholt und zusätzlich Rohextraktproben mit aufgetragen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 23 auf Seite 61.

Rohextrakte von GRF18/pGRT6310 und GRF18/pHVOS18 Transformanten wurden mit EndoH über Nacht bei 37 ^{o}C inkubiert (Siehe Material und Methoden). Die Proben wurden über einem 10%iges SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit ß-Lactamaseantikörpern hybridisiert (Abb. 23, Gel 1: b, c, i und j). In den Zellaufschlüssen lassen sich ß-Lactamasefusionen nachweisen. Das Molekulargewicht der Proteinfusion der Konstruktion pGRT2-6310 beträgt

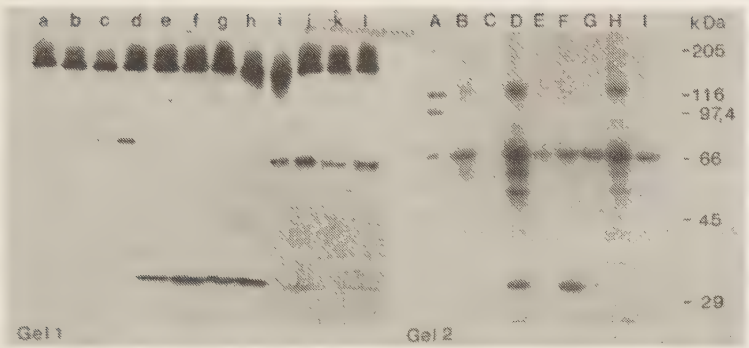


Abb. 23: Ermittlung der sezernierten Proteinmengen in GRF18/pGRT1-913, GRF18/pGRT2-6310 und GRF18/pHVOS18 Transformanten.

GRF18 Transformanten, mit den Plasmiden pGRT1-913, pGRT2-6310 oder pHVOS18, wurden auf YEP-Medium mit 2% Raffinose über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Animpfmenge der Hauptkulturen betrug 2 ml. Die Zellen wurden abzentrifugiert ,und mit Glasperlen im Braun-Homogenisator aufgeschlossen (Siehe Material und Methoden). Die Proteinkonzentration der Rohextrakte wurde bestimmt. Die Werte betrugen 25 bis 30 mg/ml (GRF18/pGRT1-913 wurde nicht ermittelt). Die Überstandsproben der Kulturmedien wurden unter Zugabe von TCA bei einer Endkonzentration von 10 % gefällt. Bei der Fällung der Überstandsproben des 2.Gels wurden 5 µg BSA hinzugefügt. Die Hybridisierung mit ß-Lactamase-Antikörpern und die Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blue erfolgte nach den Vorschriften im Material und Methodenteil.

Gel 1) 10%iges SDS-PA-Gel hybridisiert mit polyklonalen Antikörpern gegen ß-Lactamase

a) 0,5 µl	Rohextrakt	GRF18 untransf.	m.EndoH
b) 100 µl	Überstand	"	m.EndoH
c) 0,25 µl	Rohextrakt	GRF18/pGRT2-6310	m.EndoH
d) 0,50 µl	"	"	m.EndoH
e) 50 µl	Überstand	"	m.EndoH
f) 100 µl	"	"	m.EndoH
g) 50 µl	"	"	o.EndoH
h) 100 µl	"	"	o.EndoH
i) 0,25 µl	Rohextrakt	GRF18/pHVOS18	m.EndoH
j) 0,50 µl	"	"	m.EndoH
k) 70 µl	Überstand	"	m.EndoH
l) 140 µl	"	"	m.EndoH

Gel 2) 10%iges SDS-PA-Gel angefärbt mit Coomassie-Blue

A)	Proteinmarker	
B) 5,0 ml	Med. GRF18/pHVOS18	
C) 0,5 ml	"	"
D) 5,0 ml	"	GRF18/pGRT2-6310
E) 0,5 ml	"	"
F) 0,5 ml	"	GRF18/pGRT1-913
G) 0,05 ml	"	"
H) 5,0 ml	"	GRF18 untransf.
I) 0,5 ml	"	"

nach EndoH-Behandlung etwa 75800 Dalton. In den Zellaufschlüssen der GRF18/pHVOS18 Transformanten läßt sich die 64700 Dalton große ß-Lactamasefusion nachweisen (vgl. Abschnitt 3.3.10.). Vergleicht man die Bandenintensitäten dieser Proteine miteinander, so ist die Bande der ß-Lactamasefusion in GRF18/pHVOS18 Transformanten etwas kräftiger ausgebildet gegenüber der Bandenstärke der Proteinfusion in GRF18/pGRT2-6310 Transformanten. Die Expressionsrate der Fusionsgene sollte demnach etwa gleich sein. Im Überstand findet man hingegen stärkere Proteinbanden des prozessierten ß-Lactamaseproteins der Konstruktion pGRT2-6310 (Abb. 23, Gel 1: e, f, g und h). Eine Inkubation des Kulturmediums mit EndoH zeigt keinen Einfluß auf die Bandenstärke. Deutlich schwächer sind die Banden der ß-Lactamasefusion im Kulturmedium der GRF18/ pHVOS18 Transformanten (Abb. 23, Gel 1: k und l). Die im Abschnitt 3.3.11. erzielten Ergebnisse bezüglich der Verteilung der ß-Lactamasefusion pHVOS18 lassen sich bei diesem Experiment ebenfalls nachgeweisen; auch hier befindet sich etwa 2/3 der

Gesamtmenge der ß-Lactamasefusion im Rohextrakt. Bei der Konstruktion pGRT2-6310 läßt sich eine Verteilung zu Gunsten des Mediums beobachten. Etwa 3/4 der ß-Lactamase wird von GRF18/pGRT2-6310 Transformanten sezerniert. Die Messung der ß-Lactamaseaktivitäten in den Überständen ergaben folgende Werte: GRF18/pHVOS18 25 mU/ml; GRF18/pGRT2-6310 300 mU/ml.
Die ß-Lactamaseaktivität im Medium der GRF18/pGRT2-6310 Transformanten war 12-fach höher als die Aktivität im Kulturmedium der GRF18/pHVOS18 Transformanten. Die Bandenintensitäten, der beiden hier verglichenen Proteine nach der immunologischen Nachweisreaktion, zeigten jedoch keinen so deutlichen Unterschied. Die Intensität der Proteinbande der GRF18/pHVOS18 Transformanten ist etwa 1/3 so stark wie die Proteinbande im Medium der GRF18/pGRT2-6310 Transformanten.
Die Ergebnisse können zusammenfassend wie folgt interpretiert werden:
1) Das Fusionsprotein, kodiert durch pHVOS18, hat offensichtlich eine niedrigere spezifische Enzymaktivität als das prozessierte Protein der Konstruktion pGRT2-6310. 2) Die Werte der Sekretionseffizienzen, ermittelt durch Enzymaktivitätsvergleiche in Rohextrakten und Medien, können auch immunologisch bestätigt werden.

Die Daten des mit Coomassie-Blue angefärbten SDS-PA-Gels können zur groben Abschätzung der ausgeschleusten Proteinmenge herangezogen werden (Abb. 23, Gel 2: D und E). Das Kulturmedium der GRF18/pGRT1-913 (OD_{600nm} = 3) zeigt eine ß-Lactamasekonzentration von 5 bis 10 µg/ml. Dieser Wert entspricht den Berechnungen der Proteinkonzentration im Medium, die aufgrund der enzymatischen Daten (vgl. Tab. IV auf Seite 32) ermittelt wurden. Als Referenzwert wurde die BSA-Menge zugrunde genommen. Pro Gelspur wurden 5 µg BSA aufgetragen (Proteinbande 66000 Dalton). GRF18/pGRT2-6310 Transformanten (OD_{600nm} = 4) sezernieren weniger ß-Lactamaseproteine. Die Konzentration im Medium beträgt etwa 1 µg/ml (Abb. 23, Gel2: D und E). In den Proben der GRF18/pHVOS18 (OD_{600nm} = 4) Transformanten konnten keine Proteine nachgewiesen werden (Vgl Abb. 23, Gel 2: B und C). Das Fusionsprotein sollte nach EndoH-Behandlung unterhalb der BSA-Bande lokalisiert sein. Die Proteinkonzentration liegt unter der Nachweisgrenze eines Coomassie-Blue-Gels. Auch eine Wiederholung dieses Experiments mit den Invertase-ß-Lactamasefusionen pHVOS6, pHVOS14, pHVOS18 und pHVOS26 zeigte das gleiche Ergebnis. Die Fusionsproteine ließen sich auf einem Coomassie-Blue-Gel nicht nachweisen.

Die Integration der Prosequenz innerhalb einer Invertase-ß-Lactamasefusion führt zu einer gesteigerten Sekretionsrate und zum Ausschleusen eines prozessierten aktiven ß-Lactamaseproteins. Das Genprodukt der Plasmidkonstruktion pGRT2-6310 wird offensichtlich an der gleichen Prozessierungsstelle gespalten, wie das Fusionsprotein der Konstruktion pGRT1-913. Die Prozessierung und Sekretion dieser Fusionsproteine wird im nächsten Abschnitt in Hefezellen, die eine kex2 Mutation besitzen, untersucht.

3.5. Untersuchung der Expression der ß-Lactamasehybridgene, kodiert durch die Plasmide pGRT1-913 und pGRT2-6310 in kex2 Hefemutanten

S.cerevisiae kex2 Mutanten bilden kein biologisch aktives "Killer-Toxin" und keinen aktiven α-Faktor. Die Ursache hierfür ist das Fehlen einer spezifischen membrangebundenen Endopeptidase, die für das Prozessing beider sekretorischer Proteine wichtig ist (Julius et al., 1984a,b). Die Spaltsequenz dieser Endopeptidase ist Lysin-Arginin.
In den Abschnitten 3.2.5. und 3.4.3. konnte gezeigt werden, daß in pGRT1-913 und pGRT2-6310 Transformanten nur das prozessierte Protein der ß-Lactamase ausgeschleust wird. Möglicherweise ist die Prozessierung der Fusionsproteine eine Voraussetzung für das Ausschleusen der ß-Lactamase.
In diesem Abschnitt wird daher untersucht, ob diese Mutation einen Einfluß auf die Sekretion der ß-Lactamasefusionen pGRT1-913 und pGRT2-6310 ausübt.

Der mutierte α Hefestamm 78, der die Mutationen kex2 und his7 besitzt (Leibowitz und Wickner 1976), wurde unter nichtselektiven Bedingungen mit den Plasmiden pGRT1-913 und pGRT2-6310 transformiert (Reipen et al., 1982). Die mit Hilfe der Jod-Stärke-Reaktion identifizierten Transformanten wurden auf YEP-Medium mit 2 % Raffinose angezogen, und die ß-Lactamaseaktivitäten im Medium und Rohextrakten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle XII wiedergegeben.

Tabelle XII: Bestimmung der ß-Lactamaseaktivität im Kulturmedium und in Rohextrakten von kex2 Mutanten transformiert mit pGRT1-913 oder pGRT2-6310

	kex2/pGRT1-913					kex2/pGRT2-6310			
OD_{600nm}	Medium (mU)	(%)	Rohextrakt (mU)	(%)	OD_{600nm}	Medium (mU)	(%)	Rohextrakt (mU)	(%)
2,6	206	93	16	7	2,1	68	30	156	70
4,2	392	95	20	5	3,3	113	39	174	61
6,7	400	96	15	4	7,3	198	53	176	48
9,1	482	97	17	3	-	-		-	
		(95±2)		(5±2)			(40±11)		(60±11)

Die Hefetransformanten wurden auf YEP-Medium mit 2% Raffinose bei 30 °C inkubiert. Für den Rohextrakt wurden jeweils 10 bzw. 5 ml Hefekultur abzentrifugiert und mit Glasperlen im Braun-Homogenisator aufgeschlossen (siehe Material und Methoden). Proteinmessung und Enzymaktivitätsbestimmung erfolgtenach den Vorschriften im Material- und Methodenteil. Die Zahlenangaben beziehen sich auf 1 ml Rohextrakt bzw. Medium. Die in Klammern angegebenen Werte geben die Mittelwerte in Prozent an.

Aktive ß-Lactamase läßt sich in Kulturmedien transformierter kex2 Hefezellen enzymatisch nachweisen. Offensichtlich ist die Prozessierung der Fusionsproteine keine Voraussetzung für die Sekretion. Das Ausschleusen der Genprodukte erfolgt mit etwa der gleichen Sekretionseffizienz wie in GRF18 Transformanten (vgl. die Tabellen III und XI). Die ß-Lactamaseaktivität im Überstand von kex2/pGRT2-6310 Transformanten ist 2-fach nie-

driger als im Medium von transformierten GRF18 Zellen; im Gegensatz hierzu ist die Enzymaktivität im Kulturmedium von kex2/pGRT1-913 Transformanten etwa 10-fach niedriger als in GRF18 Zellen. Da die kex2 Transformanten keine leu2 Mutation tragen, konnten sie nicht unter selektiven Bedingungen angezogen werden. Möglicherweise sind die Unterschiede der Enzymaktivitäten auf eine niedrige Kopienzahl der Rekombinantplasmide zurückzuführen. Bei Stabilitätsvergleiche der Plasmide pGRT1-913 und pGRT2-6310 in transformierten GRF18 Zellen ließ sich ein höherer Verlust des Plasmids pGRT1-913 pro Generation feststellen als beim Plasmid pGRT2-6310 (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf).

Die Untersuchungen der Genexpression des Alpha-Faktors in kex2 Muntanten haben gezeigt, daß das Sexpheromon synthetisiert, aber nicht prozessiert wird. Im Kulturmedium konnte ein hochglykosyliertes biologisch inaktives Vorläufermolekül nachgewiesen werden (Julius et al., 1984b). Für den Nachweis glykosylierter Fusionsproteine im Medium von kex2/pGRT1-913 und kex2/pGRT2-6310 Transformanten, wurden Medienproben über eine Concanavalin-A-Sepharosesäule geschickt. Glykoproteine werden durch Concanavalin-A gebunden und können durch einen Puffer, der Methyl α-D-Mannopyranosid in einer Konzentation von 0,5 M enthält, eluiert werden. Als Kontrolle wurden Proben des Kulturmediums von GRF18/pGRT1-913 und GRF18/pGRT2-6310 Transformanten genommen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle XIII aufgeführt.

Tabelle XIII: Nachweis glykosylierter ß-Lactamase über Concanavalin-A-Säulenchromatographie

	Enzymaktivität			
	pGRT1-913		pGRT2-6310	
	GRF18 (mU/ml)	kex2 (mU/ml)	GRF18 (mU/ml)	kex2 (mU/ml)
Medium	103	56	11	12
Waschen mit 0,5 M NaCl	98	0	11	0
Elution mit 0,5 M NaCl plus 0,5 M MMP	0	54	0	11

200 µl Kulturmedium der Transformanten GRF18/pGRT1-913, Kex2/pGRT1-913, GRF18/pGRT2-6310 und Kex2-6310 wurden jeweils auf eine Concanavalin-A-Sepharosesäule aufgetragen. Die Säulen, mit einem Gesamtvolumen von 1,5 ml, wurden mit 3 ml Waschpuffer (0,5 M NaCl; 20mM Tris/HCl, pH 7,4) gewaschen. Glykoproteine wurden mit 6 ml Elutionspuffer (0,5 M Methyl α-D-Manno-pyranosid; 0,5 M NaCl; 20mM Tris/HCl, pH 7,4) eluiert. Die ß-Lactamaseaktivität in den Eluate wurden mit Hilfe des Nitrocefintests (siehe Material und Methoden) ermittelt. MMP: (Methyl α-D-Mannopyranosid).

Die Bindungsstudien an Concanavalin-A zeigen, daß transformierte kex2 Mutanten glykosylierte ß-Lactamasefusionsproteine sezernieren. Die ß-Lactamasemoleküle im Überstand von GRF18 Transformanten passieren ungehindert die Säule, während die ß-Lactamasefusionsproteine im Medium von transformierten kex2 Mutanten erst durch Zugabe von Methyl α-D-Mannopyranosid eluiert werden können. Die 263 Aminosäuren der ß-Lactamase in den Plasmidkonstruktionen pGRT1-913 und pGRT2-6310 weisen keine potentiellen Sequenzen für eine Glykosylierung auf. Ebenso befinden sich keine Glykosylierungssequenzen in den acht Aminosäuren des Polylinkers innerhalb der Prosequenz-ß-Lactamasefusion. Drei Konsensussequenzen für N-spezifische Seitenkettenglykosylierung sind auf der Prosequenz des Alpha-Faktors und sechs auf der Invertasesequenz der Konstruktion pGRT2-6310 vorhanden; mit den Glykosylierungssequenzen vom Profragment besitzt die Genfusion pGRT2-6310 insgesammt neun Glykosylierungssequenzen. Aus diesen Daten läßt sich ableiten, daß die kex2/pGRT1-913 und kex2/pGRT2-6310 Transformanten unprozessierte, glykosylierte ß-Lactamasefusionen sezernieren. GRF18 Transformanten hingegen schleusen ein nicht glykosyliertes prozessiertes ß-Lactamaseprotein aus. Die Prozessierung der ß-Lactamasefusionen in den Konstruktionen pGRT1-913 und pGRT2-6310 ist wie die des Alpha-Faktors abhängig von der Lysin-Arginin spezifischen Endopeptidase.

Eine immunologische Untersuchung von Rohextrakten und Kulturmedien der kex2 Transformanten soll die bisherigen Daten unterstützen. Da ein immunologischer Nachweis hochglykosylierter Fusionsproteine mit dem verwendeten ß-Lactamaseantikörper nicht möglich ist (vgl. Abschnitt 3.3.10.), wurden Rohextrakte und Medien von kex2/pGRT1-913 und kex2/pGRT2-6310 Transformanten mit EndoH über Nacht bei 37 °C inkubiert. Im Gegensatz zu den immunologischen Untersuchungen der ß-Lactamase im Kulturmedium der GRF18/pGRT1-913 und GRF18/pGRT2-6310 Transformanten (vgl. Abschnitt 3.4.3. auf Seite 58) erwies sich der Nachweis der sezernierten ß-Lactamase in kex2 Transformanten als recht schwierig. Abbildung 24 auf Seite 66 zeigt daher eine Zusammenstellung von zwei Western-Analysen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte jeweils auf einem 10%igem SDS-PA-Gel.

Im Zellaufschluß der kex2/pGRT2-6310 Transformanten läßt sich ein ß-Lactamasefusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 69000 Dalton nachweisen (Abb. 24, Gelpositionen B und C). Die Proteinbande dieser ß-Lactamasefusion ist in der Western-Analyse scharf wiedergegeben. Abbauprodukte des Proteins können im Rohextrakt immunologisch nicht nachgewiesen werden. Anders verhält es sich bei der ausgeschleusten ß-Lactamase. Im Kulturmedium der kex2/pGRT2-6310 Transformanten konnten zunächst auch nach einer EndoH-Behandlung keine ß-Lactamasemoleküle nachgewiesen werden. Erst nach Einengung von 5 ml Kulturüberstand ließen sich immunologisch Proteinbanden nachweisen (Abb.24, Gelposition D). Die Erklärung für diesen Befund kann direkt aus den immunologischen Daten abgelesen werden. Das Kulturmedium zeigte nach der Western-Analyse keine scharf abgegrenzte Proteinbanden, sondern ein Bandenspektrum hervorgerufen von ß-Lactamaseproteinen mit Molekulargewichten zwischen 44000 und 65000 Dalton. Das sezernierte ß-Lactamaseprotein, exprimiert in kex2/pGRT2-6310 Transformanten, scheint

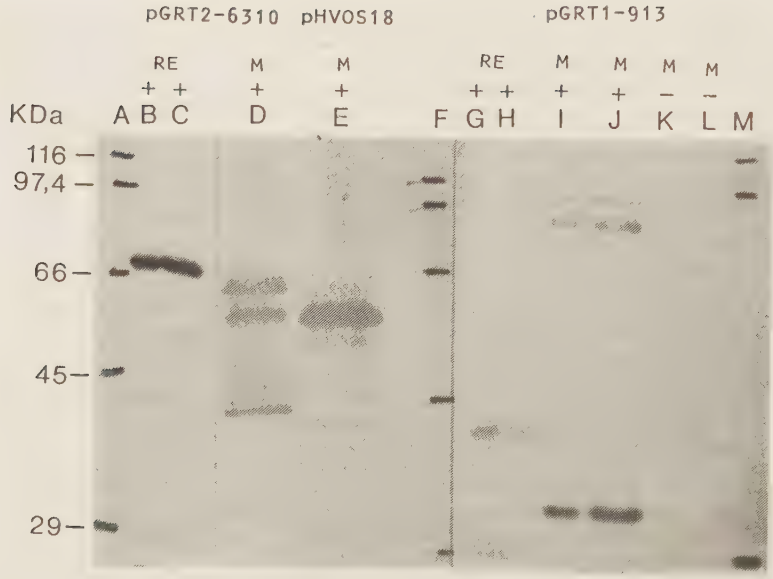


Abb. 24: Immunologische Untersuchung der ß-Lactamasefusionen im Medium von kex2/pGRT1-913 und kex2/pGRT2-6310 Transformanten nach EndoH-Behandlung

kex2/pGRT1-913, Kex2/pGRT2-6310 und GRF18/pHVOS18 Transformanten wurden auf YEP-Medium mit 2% Raffinose über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugiert und mit Glasperlen im Braun-Homogenisator aufgeschlossen (siehe Material und Methoden). Die Überstandsproben wurden unter Zugabe von TCA bei einer Endkonzentration von 10% gefällt. Rohextrakte und Proben des Kulturmediums wurden mit EndoH über Nacht bei 37 °C inkubiert (siehe Material und Methoden) und einer Western-Analyse unterzogen. RE = Rohextrakt, M = Medium, + (mit EndoH), – (ohne EndoH): A, F und M) Proteinmarker, B und C) 1 und 2 µl Rohextrakt kex2/pGRT2-6310 mit EndoH, D) 5 ml Medium kex2/pGRT2-6310, E) 5 ml Medium GRF18/pHVOS18, G und H) 0,25 und 0,50 µl Rohextrakt kex2/pGRT1-913 mit EndoH, I und J) 0,5 und 1 ml Medium kex2/pGRT1-913 mit EndoH, K und L) 2,5 und 1 ml Medium kex2/pGRT1-913 ohne EndoH.

nach EndoH-Behandlung sehr instabil zu sein. Zwei Fusionsproteine mit den Molekulargewichten von 64000 und 58000 Dalton scheinen eine etwas stabilere Proteinstruktur aufzuweisen. Zur Kontrolle wurde ebenfalls 5 ml Kulturmedium von GRF18/pHVOS18 Transformanten eingeengt und immunologisch untersucht (Abb. 24, Gelposition E). Hier konnte, wie bereits in den Abschnitten 3.3.10 und 3.3.11 gezeigt, das ß-Lactamasefusionsprodukt der Konstruktion pHVOS18 nachgewiesen werden. Abbauprodukte dieser Proteinfusion sind nur schwach zu erkennen.
Ein ähnliches Ergebnis, wie bei kex2/pGRT2-6310 Transformanten, läßt sich auch bei kex2/pGRT1-913 Transformanten erzielen. Zellaufschlüsse dieser Transformanten zeigen nach EndoH-Behandlung eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 41000 Dalton (Abb. 24, Gelpositionen G und H). Für das unprozessierte unglykosylierte Protein dieser Fusion wurde ein Molekulargewicht von 40000 Dalton errechnet (vgl. Abschniit 3.2.5. auf Seite 31). Auch bei diesem Experiment findet man nur eine Proteinbande nach der Western-Analyse. Abbauprodukte sind nicht nachweisbar. Vergleicht man hierzu die immunologi-

sche Untersuchung des Kulturmediums der kex2/pGRT1-913 Transformanten, so findet man zwei Proteinbanden mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im SDS-PA-Gel (Abb24, Gelpositionen I und J). Das Protein mit der kleinsten Wanderungsgeschwindigkeit besitzt ein Molekulargewicht von über 91000 Dalton. Das kleinere ß-Lactamaseprotein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 33000 Dalton. Beide Proteine sind im Kulturmedium ohne EndoH-Behandlung nicht nachweisbar (Abb. 24, Gelposition K und L). Das hochmolekulare Fusionsprotein wird vermutlich durch eine unvollständige EndoH Verdauung verursacht, während das kleinere Protein offensichtlich keine Zuckerreste aufweist. Dieses Produkt ist um 2000 Dalton größer als die prozessierte ß-Lactamase sezerniert aus GRF18 Transformanten. In einem in vitro Experiment, in dem die Genfusion pGRT1-913 translatiert wurde, konnte ebenfalls ein ß-Lactamaseprotein mit einem Molekulargewicht von 33000 Dalton nachgewiesen werden (Lembcke, Diplomarbeit Düsseldorf). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Vorstufen der ß-Lactamase auch durch unspezifische Proteinaseaktivitäten prozessiert werden können.

Die enzymatischen und immunologischen Untersuchungen zeigen, daß in den kex2/pGRT1-913 und kex2/pGRT2-6310 Transformanten unprozessierte ß-Lactamaseproteine sezerniert werden. Diese Proteine liegen im Medium als hochglykosylierte aktive ß-Lactamasemoleküle vor. Immunologisch können diese Proteine nur nach einer EndoH-Verdauung nachgewiesen werden. Offensichtlich sind diese Proteine nach der EndoH-Behandlung weniger stabil und anfälliger gegen Proteinaseaktivitäten. Hierdurch ließe sich erklären, warum diese Proteine erst nach Einengung von 5 bzw. 0,5 ml Kulturmedium nachgewiesen werden konnten. Das Fusionsprotein der Konstruktion pGRT2-6310 zerfällt nachweisbar in eine Reihe von Abbauprodukten mit Molekulargewichten zwischen 44000 und 65000 Dalton. Das Fusionprotein pGRT1-913 wird hingegen nach EndoH-Behandlung durch Proteinasen in ein offensichtlich stabiles Endprodukt mit einem Molekulargewicht von 33000 Dalton abgebaut.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden Studien zur Proteinsekretion der prokaryotischen ß-Lactamase in der Hefe S.cerevisiae durchgeführt. Um einen Einblick in den Transportmechanismus zu erhalten, wurde die prokaryotische ß-Lactamase mit der Preprosequenz des Alpha-Faktors, N-terminalen Aminosäuren der Invertase und mit einer Kombination, bestehend aus einer N-terminalen Invertasesequenz und der Prosequenz des Alpha-Faktors, fusioniert. Für den Nachweis der Proteinsekretion wurden enzymatische und immunologische Untersuchungen des Kulturmediums durchgeführt. Die Sekretionseffizienz wurde über das Verhältnis der Enzymaktivitäten in Rohextrakten und Medien ermittelt. Diese Methode ermöglicht einen Vergleich der Sekretionseffizienzen zwischen verschiedenen Proteinfusionen, da die Verhältnisse von Genexpressionsraten und Kopienzahl der Plasmide unbeeinflußt bleiben. Der Nachteil der Methode besteht darin, daß nur enzymatisch aktive Proteine erfaßt werden; inaktive Moleküle werden hingegen nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wurden auch gleichzeitig immunologische Untersuchungen durchgeführt, die zusätzlich Aufschluß über die Syntheseschritte der Fusionsproteine in transformierten Hefezellen geben sollten.

4.1. Sekretion der ß-Lactamase mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors

Nach Austausch der prokaryotischen Signalsequenz der ß-Lactamase gegen die Preprosequenz des Alpha-Faktors konnte eine effiziente Sekretion der ß-Lactamase in S.cerevisiae nachgewiesen werden. Im Kulturmedium der Hefetransformanten, die das Plasmid pGRT1-913 enthalten, betrug die Enzymmenge gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase bis zu 80 µg/ml. Die ß-Lactamaseaktivität von GRF18/pGRT1-913 Transformanten ist im Medium 200-fach höher als im Kulturmedium der Hefetransformanten, die das Referenzplasmid pADH040-2 enthalten. Der Export der ß-Lactamase erfolgt mit hoher Effizienz. Bis zu 90% der aktiven prozessierten ß-Lactamase wird aus Hefezellen ausgeschleust.

Die Synthese der ß-Lactamase unterliegt der Kontrolle des Alpha-Faktor-Promotors. Dies konnte durch Transformation von Zellen des **a** Paarungstyps (AH22) mit dem Plasmid pGRT1-913 nachgewiesen werden. AH22 Transformanten zeigten eine 60 bis 80-fach niedrigere ß-Lactamasekonzentration im Medium als das Kulturmedium der GRF18/pGRT1-913 Transformanten (Die Werte wurden über die spezifische ß-Lactamaseaktivität ermittelt). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Emr und Mitarbeiter bei der Untersuchung der Expression einer Alpha-Faktor-Invertasefusion (Emr et al., 1983).
Das Ausschleusen des Enzyms erfolgt nur in wachsenden Hefezellen. In der stationären Wachstumsphase der GRF18/pGRT1-913 Transformanten konnte keine Zunahme der ß-Lactamasekonzentration im Kulturmedium nachgewiesen werden. Das Medium einer spätstationären Kultur (70 Stunden) zeigte eine deutliche Abnahme der Proteinkonzentration, offenbar verursacht durch Proteindegradation. Die Sekretion des Alpha-Faktors und des Killer-Toxins erfolgt ebenfalls nur in wachsenden Hefezellen.

Der Export dieser Hefeproteine ist offensichtlich gekoppelt mit der Zellknospung und Biosynthese der Hefezellwand (vgl. Schekman und Novick, 1982).

Immunologische Studien transformierter Hefezellen haben gezeigt, daß ein prozessiertes ß-Lactamasemolekül mit einem Molekulargewicht von 31000 Dalton im Medium vorliegt. Die Preprosequenz des Hybridproteins wird, entsprechend der Reifung des Alpha-Faktors, innerhalb der Hefezelle abgespalten. Eine Beobachtung, die man bei allen bisher untersuchten Hybridproteinen des Alpha-Faktors nachweisen konnte (Emr et al., 1983; Brake et al., 1984; Bitter et al., 1984). Das Molekulargewicht der prozessierten ß-Lactamase läßt darauf schließen, daß weder die Lys-Arg noch die Glu-Ala Aminosäuresequenz innerhalb der Prosequenz als Spaltstelle spezifischer Endopeptidasen erkannt werden. Für die effiziente Sekretion der Alpha-Faktor-Hybridproteine ist die Prozessierung der Glu-Ala Spaltstelle, die von der Dipeptidylaminopeptidase (yscIV) erkannt wird, nicht notwendig (Bitter et al., 1984; Brake et al., 1984). Wie aus den Studien von Bitter und Brake hervorgeht, stellt die Dipeptidylaminopeptidase einen limitierenden Faktor für die Prozessierung von Hybridproteinen dar, die von Plasmiden mit hoher Kopienzahl kodiert werden. Die Proteine zeigen daher nur eine Teilabspaltung der Glu-Ala Sequenz, oder besitzen nach der Prozessierung noch die vollständige $(Glu-Ala)_3$-Sequenz an ihrem N-terminalen Ende.
Alle bisher untersuchten Hybridproteine, die die Preprosequenz des Alpha-Faktors besitzen, werden an der Lys-Arg Spaltstelle geschnitten. Die Alpha-Faktor-ß-Lactamasefusion zeigt hierin eine Ausnahme. Aufgrund des Molekulargewichts des prozessierten ß-Lactamasemoleküls läßt sich eine Spaltstelle innerhalb der Prosequenz vermuten, die 15 Aminosäuren vor der Lys-Arg-Spaltstelle lokalisiert ist. Die denkbare Prozessierungsstelle besitzt die Aminosäuresequenz Ala-Ala-Lys-Glu-Glu. Es ist bekannt, daß in Eukaryonten Hormonpeptide und Neurotransmitter von Vorläufermolekülen gebildet werden, die endoproteolytisch an basischen Aminosäuresequenzen, die die reife Hormonsequenz flankieren, prozessiert werden (siehe Übersichtsartikel von Herbert und Uhler, 1982). Auch in der Hefe konnten zusätzliche Prozessierungsstellen bei vergleichbaren Alpha-Faktorhybridproteinen nachgewiesen werden. So fanden Bitter und Mitarbeiter zwei Spaltstellen innerhalb des Alpha-Faktor-ß-Endorphin-Vorläufermoleküls. Diese Prozessierungsstellen konnten auf der carboxyterminalen Seite der Aminosäure Lysin innerhalb des ß-Endorphins an den Positionen Glu(8)-Lys(9)-Ser(10) und Phe(18)-Lys(19)-Asn(20) lokalisiert werden (Bitter et al., 1984). Die Einführung einer zweiten Lys-Arg Spaltstelle innerhalb einer Alpha-Faktorfusion mit dem menschlichen Wachstumsfaktor führte dazu, daß das Vorläufermolekül zu 20% an der künstlich eingeführten Spaltstelle geschnitten wurde (Brake et al., 1984). Die Effizienz der Sekretionsrate wurde hierdurch nicht beeinflußt. Die exakte Prozessierung der Preprosequenz an der Lys-Arg Position ist demnach für die Sekretion nicht notwendig. Dies ist auch in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß der Alpha-Faktor in kex2-Mutanten als unprozessiertes glykosyliertes Protein ausgeschleust wird (Julius et al., 1984b). Offenbar können durch Proteinfusionen ursprüngliche Spaltstellen für spezifische Peptidasen verdeckt und durch andere Aminosäuresequenzen ersetzt werden. So wird, bei der

Alpha-Faktor-Invertase Fusion die Signalsequenz der Invertase, die in der Konstruktion noch zu zweidrittel intakt vorhanden ist, nicht mehr durch die Signalpeptidase abgespalten (Emr et al., 1983).

Haploide Hefezellen des Alpha-Paarungstyps, die eine kex2-Mutation tragen, synthetisieren ein unprozessiertes, inaktives Alpha-Faktor Vorläufermolekül, das hochglykosyliert im Kulturmedium nachweisbar ist (Julius et al., 1984b). Das Molekulargewicht dieses inaktiven Sexpheromons beträgt 120000 Dalton. Kex2 Mutanten, transformiert mit dem Plasmid pGRT1-913, sezernieren ebenfalls ein glykosyliertes Fusionsprodukt, wie die Bindung an Concanavalin A gezeigt hat. GRF18 Transformanten hingegen sezernieren eine prozessierte ß-Lactamase, die keinen glykosylierten Proteinanteil mehr enthält. Da die kex2 Proteinase im Golgi-Komplex lokalisiert ist (Julius et al., 1984b), erfolgt offensichtlich ein Transfer der ß-Lactamase über den Golgi-Komplex zur Zelloberfläche.

Aus den Daten wird deutlich, daß die ß-Lactamase mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors, ebenso wie andere sekretorische eukaryotische Proteine, fusioniert mit der Preprosequenz des Alpha-Faktors (Emr et al., 1983; Brake et al., 1984; Bitter et al., 1984), durch den Sekretionsweg der Hefezelle (ER, Golgi-Komplex, sekretorische Vesikel, Exocytose) geschleust wird.

4.2. Invertase-ß-Lactamasefusionen zeigen unterschiedliche Sekretionseffizienzen in S.cerevisiae

Vier verschiedene Plasmide mit Invertase-ß-Lactamasefusionen konnten konstruiert werden, die in transformierten Hefezellen aktive ß-Lactamaseproteine kodieren. Der Invertaseanteil der Hybridproteine ist unterschiedlich groß. Alle Proteine besitzen jedoch die vollständige Signalsequenz der Invertase. Das ß-Lactamaseprotein, kodiert durch pHVOS26, trägt einen Invertaseanteil von etwa 50 Aminosäuren und ist mit einem Molekulargewicht von 35500 Dalton nach EndoH-Behandlung das kleinste Fusionsprotein. Die Proteine der Konstrukte pHVOS6 und pHVOS18 sind gleich groß. Der Invertaseanteil beträgt etwa 250 Aminosäuren. Die Molekulargewichte nach EndoH-Behandlung betragen 64700 Dalton. Das Plasmid pHVOS14 kodiert ein Fusionsprotein mit einem Invertaseanteil von etwa 270 Aminosäuren. Das Protein besitzt nach EndoH-Behandlung ein Molekulargewicht von 66500 Dalton.

Immunologische Untersuchungen der Rohextrakte von Transformanten, die diese Plasmidkonstruktionen enthalten, zeigen Vorläufermoleküle, deren Molekulargewichte auf Core-Glykosylierung hindeuten. Nachgewiesen wurde die Core-Glykosylierung beim Fusionsprotein der Konstruktion pHVOS18 mit Hilfe des Antibiotikums Tunicamycin. Hefezellen, die in Gegenwart von Tunicamycin angezogen wurden, zeigten in Rohextrakten ein Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 64700 Dalton. Ohne Tunicamycin angezogene Zellen enthielten in Rohextrakten ein Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 79600 Dalton. Da Tunicamycin speziell die N-spezifische Seitenkettenglykosylierung von Glykoproteinen verhindert (Duskin und Mahoney,

1982), ist die Molekulargewichtszunahme der ß-Lactamasefusion auf Glykosylierung des Fusionsproteins zurückzuführen. Gleiche Ergebnisse wurden auch durch Behandlung der Rohextrakte mit dem Enzym EndoH erzielt. Dieses Enzym spaltet den Zuckeranteil N-spezifischer Core-Oligosaccharide glykosylierter Proteine (Tarentino and Maley, 1974). Alle vier Fusionsproteine zeigen in Rohextrakten nach Inkubation mit EndoH kleinere Molekulargewichte als die Fusionsproteine in unbehandelten Rohextrakten. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Proteine als core-glykosylierte Vorstufen exprimiert werden. Sie werden demnach mit Hilfe der Invertasesignalsequenz ins ER-Lumen der Hefe geschleust; ein klarer Gegensatz zu der prokaryotischen Signalsequenz der ß-Lactamase. Wie bereits erwähnt, zeigen Hefetransformanten, die Plasmide mit dem Ampicillinresistenzgen besitzen, wie z.B. pMP78 oder pADH040-2, in ihren Rohextrakten auch unprozessierte ß-Lactamasemoleküle, die an freien Ribosomen translatiert werden (Roggenkamp et al., 1983).

Es lassen sich auch unglykosylierte Invertase-ß-Lactamasemoleküle in Rohextrakten dereprimierter und reprimierter Zellen nachweisen (Bielefeld, pers. Mitteilung). Diese Fusionsproteine werden offensichtlich, wie die konstitutive cytoplasmatische Invertase (Carlson et al., 1982), von kürzeren mRNA-Molekülen, die nicht die Nukleotidsequenz der Invertasesignalsequenz enthalten, an freien Ribosomen translatiert. Sie entsprechen somit cytoplasmatischen Proteinen.

Die mit Hilfe der Invertasesignalsequenz ins ER-Lumen eingeschleusten ß-Lactamasefusionsproteine werden zum Teil in hochglykosylierte Proteine umgewandelt. Der immunologische Nachweis dieser ß-Lactamaseproteine konnte nur indirekt nach einer EndoH-Behandlung der Rohextrakte transformierter Hefezellen nachgewiesen werden, da der verwendete ß-Lactamaseantikörper keine Bindungsreaktion mit hochglykosylierten ß-Lactamasemolekülen eingeht. Ein gleicher Befund zeigte sich bei der Fusion des Prochymosins mit der Invertase. Auch hier konnten hochglykosylierte Fusionsprodukte erst nach EndoH-Behandlung immunologisch nachgewiesen werden (Smith et al., 1985). Um so erstaunlicher ist die Tatsache, daß die hochglykosylierten Invertase-ß-Lactamasefusionen auch nicht mit einem Antikörper gegen glykosylierte Invertase sichtbar gemacht werden konnten (Daten wurden nicht gezeigt). Die von Smith (1985) diskutierte Möglichkeit, daß die zusätzlichen Zuckerreste einen elektrophoretischen Transfer auf Nitrocellulose verhindern, ist sehr unwahrscheinlich. Hochglykosylierte Invertase bzw. Alpha-Faktormoleküle lassen sich durch Western-Analyse nachweisen (Bielefeld, Dissertation in Vorbereitung; Julius et al., 1984b). Es ist daher anzunehmen, daß eine Veränderung der Proteinstruktur durch die Glykosylierung stattfindet, sodaß die spezifischen Antikörperbindungsstellen zerstört oder verdeckt werden.
Die mit EndoH behandelten Rohextrakten der Hefetransformanten zeigten in einer Western-Analyse eine bedeutend stärkere Proteinbande als unbehandelte Hefezellaufschlüsse. Dieses Ergebnis ist nur dadurch zu erklären, daß hochglykosylierte ß-Lactamaseproteine in den Rohextrakten vorliegen, die nach Abspaltung des Zuckeranteils mit Antikörpern immunologisch erfaßt werden können. Der Glykosylierungsgrad der Fusionsproteine beweist, daß sie über das Endoplasmatische Reticulum der

Hefezelle zum Golgi-Komplex transportiert werden, da nur hier diese Glykosylierung erfolgt (Leblond und Bennett, 1977; Farquhar und Pallade 1981).

Vergleiche der ß-Lactamaseaktivitäten in Zellaufschlüssen und Medien zeigen, daß, mit Ausnahme der Proteinfusion in pHVOS14 Transformanten, bis zu 20% der ß-Lactamaseaktivität im Medium gemessen werden kann. Hefezellen, die mit dem Plasmid pHVOS14 transformiert wurden, zeigen unter dereprimierten Bedingungen im Medium etwa 40% Enzymaktivität. Die enzymatisch ermittelten Meßdaten lassen sich auch durch immunologische Quantifizierung der ß-Lactamase bestätigen. Hefezellen, transformiert mit dem Plasmid pHVOS18 zeigen nach EndoH-Behandlung in ihren Zellaufschlüssen etwa 70% der gesamten ß-Lactamase. Das Fusionsprotein der Konstruktion pHVOS26 konnte in einem Verhältnis von 50% sowohl im Rohextrakt als auch im Medium immunologisch nachgewiesen werden. In Transformanten, die das Plasmid pHVOS14 enthalten, lag eine Verteilung zugunsten des Mediums vor. Etwa 70% der Enzymmenge ließ sich im Kulturmedium und nur 30% im Rohextrakt immunologisch nachweisen.
Die Differenzen zu den enzymatisch bestimmten Werten lassen sich durch unterschiedliche Aktivitäten der core- und hochglykosylierten Fusionsproteine erklären (siehe Seite 74).

Mit Hilfe N-terminaler Invertasesequenzen wird die ß-Lactamase, wenn auch mit einer deutlich niedrigeren Sekretionseffizienz als bei der Preprofusion des Alpha-Faktors, aus transformierten Hefezellen sezerniert. Im Gegensatz hierzu konnte eine Sekretion des cytoplasmatischen Proteins der ß-Galaktosidase in transformierten Hefezellen nicht nachgewiesen werden. Emr und Mitarbeiter (1984) fusionierten N-terminale Invertasesequenzen vor die prokaryotische ß-Galaktosidase (lacZ). Ihre Konstruktionen umfaßten einen Sequenzbereich von 4 bis 90% des Invertasegens, wobei in allen Proteinfusionen die vollständige Invertasesignalsequenz vorhanden war. Auch sie konnten aktive glykosylierte Fusionsproteine in Zellextrakten nachweisen. Eine Translokation der Produkte zur Zellwand oder ins Medium konnte nicht gezeigt werden. Möglicherweise verhindern bestimmte Aminosäuren der ß-Galaktosidase den vollständigen Durchtritt der Proteinfusionen durch die ER-Membran, was bereits für die Cytoplasmamembran in E.coli nachgewiesen werden konnte (Silhavy et al., 1983; Rasmussen et al., 1984). Dies trifft für die ß-Lactamase nicht zu. Die Ergebnisse der ß-Lactamasefusionen mit der Preprosequenz des Alpha-Faktors und mit N-terminalen Sequenzen der Invertase zeigen, daß ein vollständiger Transfer der Fusionsproteine durch die ER-Membran in Hefe erfolgt.

Eine sehr niedrige Sekretionseffizienz, vergleichbar mit der Sekretion der authentischen ß-Lactamase in Hefe (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf), zeigte die Invertase-Prochymosinfusion in transformierten Hefezellen (Smith et al., 1985). Weniger als 10% des synthetisierten Fusionsproteins ließ sich im Medium nachweisen, wobei zusätzlich neben hochglykosylierten Prochymosinmolekülen auch core-glykosylierte Vorläufermoleküle auftraten; ein deutlicher Hinweis, daß ein Teil der Proteine aufgrund lysierter Zellen ins Medium gelangte. Erst durch Isolierung von Mutanten mit verbesserten Sekretionseigenschaften konnte die Sekretionseffizienz gesteigert werden.

Im Gegensatz hierzu ließen sich core-glykosylierte Vorläufermoleküle der Invertase-ß-Lactamasefusionen nur in Zellaufschlüssen nicht jedoch im Kulturmedium transformierter Hefezellen nachweisen. Wie aus den experimentellen Daten hervorgeht, befinden sich im Medium ausschließlich hochglykosylierte ß-Lactamasefusionen, die den vollständigen Sekretionsweg der Hefe durchlaufen haben.

Die Prochymosinfusion besitzt neben den 19 Aminosäuren der Signalsequenz der Invertase 11 weitere Aminosäuren des Proteins. Die kleinste Invertase-ß-Lactamasefusion (pHVOS26) hingegen trägt noch mindestens 30 zusätzliche Aminosäuren der Invertase. Die Sekretionseffizienz des Proteins liegt bei 20 bis 50%, wie enzymatische und immunologische Untersuchungen gezeigt haben. Es wird offensichtlich besser sezerniert als das Invertase-Prochymosinprotein. Eine weitere Steigerung der Sekretionseffizienz konnte bei der Invertase-ß-Lactamasefusion, kodiert durch das Plasmid pHVOS14, festgestellt werden. Dieses Protein besitzt neben der Signalsequenz noch etwa 250 Aminosäuren der Invertase und wird zu 40 bis 70% sezerniert. Die Daten lassen die Schlußfolgerung zu, daß N-terminale Sequenzen der Invertase die Sekretion der Fusionspodukte beeinflussen.

Es gibt experimentelle Hinweise, daß die Glykosylierung sekretorischer Proteine für den Ausschleusungsvorgang dieser Proteine von Bedeutung ist (Siehe Übersichtsartikel von Olden et al., 1982). So verhindert die Eliminierung der Aminosäuresequenz für N-spezifische Seitenkettenglykosylierung innerhalb des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Glykoproteins den Transport des Proteins vom Golgi-Komplex zur Zelloberfläche (Machamer et al., 1985). Der Einbau von Konsensussequenzen für N-spezifische Seitenkettenglykosylierung innerhalb eines membrangebundenen Hybridproteins des Rattenwachstumshormons führte hingegen zum Transport des Proteins zur Zelloberfläche (Guan et al., 1985).

Für die Sekretion der Invertase-ß-Lactamasefusionsproteine scheint der Glykosylierungsgrad nicht den entscheidenden Faktor darzustellen. Die Prochymosinfusion und die ß-Lactamasefusion der Konstruktion pHVOS26 besitzen die gleiche Konsensussequenz für N-spezifische Seitenkettenglykosylierung innerhalb ihres Invertaseanteils. Beide Proteine werden glykosyliert aber unterschiedlich gut sezerniert. Die Fusionsproteine, kodiert durch die Plasmide pHVOS6 und pHVOS18, besitzen sechs Konsensussequenzen für Glykosylierung. Auch sie werden als Glykoproteine ausgeschleust, zeigen aber niedrigere Sekretionseffizienzen als das Protein der Fusion pHVOS26. Das Fusionsprotein der Konstruktion pHVOS14 hingegen, das ebenfalls nur sechs Konsensussequenzen aufweist, wird als Glykoprotein wesentlich besser sezerniert. Aus diesen Daten läßt sich schlußfolgern, daß nicht die Glykosylierung allein, sondern die Proteinstruktur für den Ausschleusungsprozeß von Bedeutung ist. Daß Proteinstrukuren die Sekretionsrate beeinflussen können, wurde anhand einiger Experimente nachgewiesen. Bereits das Einfügen einer zusätzlichen Aminosäure kann die Sekretion vollständig verhindern (Wu et al., 1983). Auch Mutationen innerhalb des SUC2 Gens zeigen einen drastischen Effekt auf die Sekretion des Genproduktes. Der Austausch der Amino-

säure Threonin an der Position 64 der Invertase gegen die Aminosäure Isoleucin veringert die Sekretionsgeschwindigkeit des Proteins um das Siebenfache (Schauer et al., 1985). Deletionen oder Integrationen von Aminosäuren innerhalb des Invertasegens führen zu nicht sekretierbaren Genprodukten, die im ER-Lumen transformierter Hefezellen nachweisbar sind (Bielefeld, Dissertation in Vorbereitung).

Die Unterschiede in den Sekretionseffizienzen der verschiedenen Invertase-ß-Lactamaseproteine lassen sich durch unterschiedliche Sekretionsraten erklären. Die Sekretionsrate wird hier verstanden als die Geschwindigkeit mit der ein Protein ausgeschleust wird. Das Einschleusen ins ER-Lumen ist offensichtlich kein limitierender Faktor, da alle Fusionsproteine zumindest core-glykosyliert werden. Zwei weitere Schritte innerhalb des Sekretionsweges können die Sekretionsrate beeinflussen: zum einen der Transport der core-glykosylierten Zwischenprodukte vom ER zum Golgi-Komplex, des weiteren der Transfer hochglykosylierter Proteine zur Zelloberfläche mit Hilfe sekretorischer Vesikel. Sowohl core- als auch hochglykosylierte Fusionsproteine lassen sich in Hefezellaufschlüssen nachweisen. Im Gegensatz hierzu sind Vorstufen der sekretorischen Invertase nur durch "Pulse-chase"-Experimente nachweisbar (Schauer et al., 1985). Dies zeigt bereits, daß unterschiedliche Verweilzeiten für die authentische Invertase und den ß-Lactamasefusionen innerhalb der Zellkompartimente vorliegen müssen. Während bei der Untersuchung der Invertase-Prochymosinfusion in Hefezellen hauptsächlich eine core-glykosylierte Vorstufe nachweisbar war (Smith et al., 1985), sind die Invertase-ß-Lactamasefusionen zum größtenteil hochglykosyliert, nachgewiesen durch eine deutliche Zunahme der Bandenintensität nach EndoH-Behandlung. Die geringe Sekretion des Prochymosins ist auf einen limitierenden Transport des Proteins vom ER zum Golgi-Komplex zu erklären (Smith et al., 1985). Für die Invertase-ß-Lactamasefusionen scheint hingegen der zweite Schritt, vom Golgi-Komplex zur Zellwand, limitierend, wobei das Fusionsprotein der Konstruktion pHVOS14 offensichtlich hier eine höhere Transportrate aufweist, als die übrigen Invertase-ß-Lactamasefusionen. Möglicherweise erlauben die zusätzlichen Aminosäuren des Invertaseanteils der Konstruktion pHVOS14 eine für die Sekretion günstigere Proteinfaltung, wodurch sich die gesteigerte Sekretionsrate erklären ließe.

Die unprozessierte ß-Lactamase ist enzymatisch inaktiv (Roggenkamp et al., 1985). Um so erstaunlicher ist die Tatsache, daß Invertasesequenzen fusioniert mit ß-Lactamase enzymatisch aktive Proteine ergeben. Im Kulturmedium transformierter Hefezellen konnten jedoch nur niedrige Enzymaktivitäten gemessen werden (maximal 100 mU/ml). Die hochglykosylierten Fusionsproteine besitzen offensichtlich nur geringe ß-Lactamaseaktivitäten. Im Gegensatz hierzu konnten in Rohextrakten verhältnismäßig hohe Werte gemessen werden. So zeigten Zellaufschlüsse der EK1 Transformanten, die das Plasmid pHVOS18 enthielten, 1/3 der Enzymaktivität, die in Transformanten mit dem Plasmid pADH040-2 gemessen wurden (Reipen, Diplomarbeit 1982) bezogen jeweils auf 1 mg Rohextrakt. Die core-glykosylierten Vorstufen besitzen vermutlich eine höhere Enzymaktivität, als die hochglykosylierten Proteine. Dies würde auch die

Differenzen zwischen den enzymatisch und immunologisch bestimmten Verhältnissen der ß-Lactamaseverteilung in Rohextrakten und Medien erklären. Die aufgrund immunologischer Daten abgeschätzte Verteilung der Fusionsproteine besitzt jedoch nicht die Genauigkeit der enzymatischen Verteilungsstudien. Dennoch belegen sie eindeutig die unterschiedlichen Sekretionseffizienzen der verschiedenen Invertase-ß-Lactamasefusionen.

4.3. Die Prosequenz des Alpha-Faktors ist ein Sortiersignal für die Proteinsekretion in S.cerevisiae

Die bisher diskutierten Ergebnisse zeigen, daß eine hohe Sekretionseffizienz der ß-Lactamase nur mit Hilfe der Preprosequenz des Alpha-Faktors erzielt werden konnte. Diese Sequenz beinhaltet demnach eine Informationseinheit, die offensichtlich den Sekretionsvorgang positiv beeinflußt. Die Presequenz zeigt in ihrer Primärstruktur die Eigenschaften von Signalsequenzen (Julius et al., 1984a). Die Bedeutung der Prosequenz konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Um hierin einen Einblick zu bekommen, wurde die Prosequenz des Alpha-Faktors in eine Invertase-ß-Lactamasefusion eingebaut. Die Integration dieser Aminosäuresequenz führt zum Ausschleusen einer prozessierten aktiven ß-Lactamase aus transformierten Hefezellen. Durch immunologische Untersuchungen der Kulturmedien konnte gezeigt werden, daß die ß-Lactamasemoleküle der Plasmidkonstruktionen pGRT1-913 und pGRT2-6310 das gleiche Molekulargewicht besitzen. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Prozessierungsstelle der Prosequenz auch noch erkannt wird, wenn sie innerhalb des Proteins lokalisiert ist. Wie bereits unter 4.1. diskutiert wurde, ist die Prozessierung ein deutliches Indiz für die Translokation des Proteins vom ER-Lumen zum Golgi-Komplex, da in diesem Organell die spezifische Endopeptidase, die verantwortlich ist für die Prozessierung des Alpha-Faktors, lokalisiert ist (Julius et al., 1984b).

GRF18 und AH22 Hefezellen, die mit dem Rekombinantplasmid pGRT2-6310 transformiert wurden, sezernieren ß-Lactamase unter dereprimierten Wachstumsbedingungen (2%Raffinose) in vergleichbaren Mengen. Die Expression der ß-Lactamasefusion ist unabhängig vom Paarungstyp und erfolgt in (a) und (α) Zellen. Im Medium von Hefetransformanten, die auf 5% Glucose angezogen wurden, konnte keine ß-Lactamase nachgewiesen werden. Die vorliegenden Daten zeigen, daß in der Konstruktion pGRT2-6310 das Fusionsprotein durch den Invertasepromotor kontrolliert wird.
Gegenüber den Vektoren pHVOS6, 18 und 26 zeigt die ß-Lactamasefusion der Konstruktion pGRT2-6310 eine gesteigerte Sekretionseffizienz. Im Kulturmedium der GRF18/pGRT2-6310 Transformanten konnten 55% der Gesamtaktivität der ß-Lactamase nachgewiesen werden. Die aufgrund enzymatischer Bestimmung ermittelten Sekretionseffizienzen der Plasmide pHVOS6, 18 und 26 betrugen maximal 20 Prozent. Die ß-Lactamasefusion der Konstruktion pGRT2-6310 wurde sequenziert (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf). Der Invertaseteil beträgt 609 Bp, er ist damit kleiner als der Invertaseteil der Plasmidkonstruktion pHVOS6 und pHVOS18 (etwa 750 Bp), deutlich größer jedoch als bei der Konstruktion pHVOS26 (ca. 150 Bp).
Die Steigerung der Sekretionseffizienz der Proteinfusion

Differenzen zwischen den enzymatisch und immunologisch bestimmten Verhältnissen der ß-Lactamaseverteilung in Rohextrakten und Medien erklären. Die aufgrund immunologischer Daten abgeschätzte Verteilung der Fusionsproteine besitzt jedoch nicht die Genauigkeit der enzymatischen Verteilungsstudien. Dennoch belegen sie eindeutig die unterschiedlichen Sekretionseffizienzen der verschiedenen Invertase-ß-Lactamasefusionen.

4.3. Die Prosequenz des Alpha-Faktors ist ein Sortiersignal für die Proteinsekretion in S.cerevisiae

Die bisher diskutierten Ergebnisse zeigen, daß eine hohe Sekretionseffizienz der ß-Lactamase nur mit Hilfe der Prepro-sequenz des Alpha-Faktors erzielt werden konnte. Diese Sequenz beinhaltet demnach eine Informationseinheit, die offensichtlich den Sekretionsvorgang positiv beeinflußt. Die Presequenz zeigt in ihrer Primärstruktur die Eigenschaften von Signalsequenzen (Julius et al., 1984a). Die Bedeutung der Prosequenz konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Um hierin einen Einblick zu bekommen, wurde die Prosequenz des Alpha-Faktors in eine Invertase-ß-Lactamasefusion eingebaut. Die Integration dieser Aminosäuresequenz führt zum Ausschleusen einer prozessierten aktiven ß-Lactamase aus transformierten Hefezellen. Durch immunologische Untersuchungen der Kulturmedien konnte gezeigt werden, daß die ß-Lactamasemoleküle der Plasmidkonstruktionen pGRT1-913 und pGRT2 6310 das gleiche Molekulargewicht besitzen. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Prozessierungsstelle der Prosequenz auch noch erkannt wird, wenn sie innerhalb des Proteins lokalisiert ist. Wie bereits unter 4.1. diskutiert wurde, ist die Prozessierung ein deutliches Indiz für die Translokation des Proteins vom ER-Lumen zum Golgi-Komplex, da in diesem Organell die spezifische Endopeptidase, die verantwortlich ist für die Prozessierung des Alpha-Faktors, lokalisiert ist (Julius et al., 1984b).

GRF18 und AH22 Hefezellen, die mit dem Rekombinantplasmid pGRT2-6310 transformiert wurden, sezernieren ß-Lactamase unter dereprimierten Wachstumsbedingungen (2%Raffinose) in vergleichbaren Mengen. Die Expression der ß-Lactamasefusion ist unabhängig vom Paarungstyp und erfolgt in (a) und (α) Zellen. Im Medium von Hefetransformanten, die auf 5% Glucose angezogen wurden, konnte keine ß-Lactamase nachgewiesen werden. Die vorliegenden Daten zeigen, daß in der Konstruktion pGRT2-6310 das Fusionsprotein durch den Invertasepromotor kontrolliert wird.
Gegenüber den Vektoren pHVOS6, 18 und 26 zeigt die ß-Lactamasefusion der Konstruktion pGRT2-6310 eine gesteigerte Sekretionseffizienz. Im Kulturmedium der GRF18/pGRT2-6310 Transformanten konnten 55% der Gesamtaktivität der ß-Lactamase nachgewiesen werden. Die aufgrund enzymatischer Bestimmung ermittelten Sekretionseffizienzen der Plasmide pHVOS6, 18 und 26 betrugen maximal 20 Prozent. Die ß-Lactamasefusion der Konstruktion pGRT2-6310 wurde sequenziert (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf). Der Invertaseteil beträgt 609 Bp, er ist damit kleiner als der Invertaseteil der Plasmidkonstruktion pHVOS6 und pHVOS18 (etwa 750 Bp), deutlich größer jedoch als bei der Konstruktion pHVOS26 (ca. 150 Bp).
Die Steigerung der Sekretionseffizienz der Proteinfusion

pGRT2-6310 ist nicht allein zurückzuführen auf die Prozessierung des Fusionsproteins und damit auf das Ausschleusen eines aktiveren ß-Lactamasemoleküls. Auch in kex2/pGRT2-6310 Transformanten, die ein unprozessiertes glykosyliertes Fusionsprotein sezernieren, läßt sich eine Sekretionseffizienz von 40% ermitteln, die damit günstiger ausfällt als die Sekretionseffizienzen der Invertase-ß-Lactamasefusionen pHVOS6, 18 und 26. Nur in Transformanten, die das Plasmid pHVOS14 enthielten, konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Der positive Einfluß der Integration der Prosequenz des Alpha-Faktors auf die Sekretion der Invertase-ß-Lactamasefusion konnte auch immunologisch nachgewiesen werden. Das Kulturmedium von GRF18/pGRT2-6310 Transformanten zeigte eindeutig eine höhere ß-Lactamasekonzentration als das Medium von GRF18/pHVOS18 Hefezellen, wie durch Vergleiche der Bandenintensitäten der ß-Lactamaseproteine nach Western-Analyse gezeigt werden konnte. Diese Beobachtung wird nicht verursacht durch eine gesteigerte Genexpressionsrate oder durch ein Kopienzahleffekt der Plasmide. Bei einer Wiederholung des Experiments wurden Zellaufschlüsse gleicher Proteinkonzentrationen von GRF18/pHVOS18 und GRF18/pGRT2-6310 Transformanten mit EndoH behandelt und über ein SDS-PA-Gel aufgetrennt. Die Proteinbande der ß-Lactamasefusion pHVOS18 war etwas kräftiger ausgebildet als die ß-Lactamasevorstufe im Rohextrakt der GRF18/pGRT2-6310 Transformanten. Im Kulturmedium der GRF18/pGRT2-6310 Hefezellen war die Bandenintensität der prozessierten ß-Lactamase wesentlich kräftiger als die unprozessierte Proteinfusion der Konstruktion pHVOS18 im Medium der transformierten Zellen. Für die Proteinfusion pHVOS18 konnte auch bei diesem Experiment immunologisch eine Sekretionseffizienz von 30% ermittelt werden (vgl. Abschnitt 4.3.), während die Konstruktion pGRT2-6310 mit über 70% ausgeschleust wird.

Die verschiedenen Bandenintensitäten der ß-Lactamaseproteine, die in den Western-Analysen zu erkennen sind, werden nicht durch unterschiedliche Affinitäten des ß-Lactamaseantikörpers zu den Proteinen verursacht. Auch mit Hilfe eines Coomassie-Blue angefärbten SDS-PA-Gels konnten die unterschiedlichen ß-Lactamasekonzentrationen im Kulturmedium bestätigt werden. Die prozessierte ß-Lactamase, kodiert durch die Plasmide pGRT1-913 und pGRT2-6310, lassen sich mit dieser Methode eindeutig nachweisen, sodaß eine grobe Abschätzung der Proteinkonzentrationen der ausgeschleusten ß-Lactamase möglich war. Die Proteinkonzentration der ß-Lactamasefusion pHVOS18 liegt jedoch unter der Nachweisgrenze eines mit Coomassie-Blue angefärbten SDS-PA-Gels. Eine Wiederholung des Experiments führte zum gleichen Ergebnis. Auch das mit einer Sekretionseffizienz von 40% sezernierte Fusionsprodukt der Konstruktion pHVOS14 konnte im Medium mit Hilfe eines Coomassie-Blue angefärbten SDS-PA-Gel nicht nachgewiesen werden.

Diese Daten zeigen, daß die Integration der Alpha-Faktor Prosequenz einen positiven Effekt auf die Proteinsekretion der Fusion pGRT2-6310 ausübt. Hierfür lassen sich zwei Erklärungsmöglichkeiten anführen:
1) Die Prosequenz des Alpha-Faktors ist ein Sortiersignal für die Proteinsekretion in S.cerevisiae. Die Invertaseanteile der Plasmide pHVOS6, 18 und 26 reichen nicht aus um eine hohe Sekretionseffizienz zu ermöglichen. Hier fehlen offensichtlich

Sortiersignale oder werden aufgrund einer für die Sekretion ungünstigen Tertiärstruktur der vorhandenen Invertasesequenzen nicht korrekt ausgebildet. Die Signalsequenz der Invertase ist allein jedoch nicht ausreichend für einen effektiven Transfer. Durch den Einbau der Prosequenz erhält die Invertase-ß-Lactamasefusion pGRT2-6310 ein Sortiersignal. Die Sekretionseffizienz wird gesteigert. Das Plasmid pGRT2-6310 besitzt benachbart zur Prosequenz des Alpha-Faktors noch zusätzlich zweidrittel der Presequenz. Aufgrund der Plasmidkonstruktion läßt sich daher nicht ausschließen, daß die vorhandene Presequenz für den gerichteten Transfer ebenfalls notwendig ist. Diese Sequenz wird bei der Expression des Alpha-Faktors nicht cotranslational abgespalten (Julius et al., 1984a,b). Die Presequenz des Alpha-Faktors ist vergleichbar den Signalsequenzen anderer sekretorischer Proteine (Julius et al., 1984a). Wie die experimentellen Daten der Invertase-ß-Lactamasefusionen zeigen, sind Signalsequenzen anscheinend nicht ausreichend für einen wirkungsvollen Transfer sekretorischer Proteine. Es ist somit recht unwahrscheinlich, daß die Presequenz des Alpha-Faktors allein die Funktion eines Sortiersignals erfüllt. Diese Funktion müßte vielmehr der Prosequenz des Alpha-Faktors zugeordnet werden. Die Sequenz besitzt nicht nur Glykosylierungssequenzen und die Prozessierungsstellen für spezifische Proteinasen, sondern ihr kann auch aufgrund der Daten eine Proteinstruktur zugeordnet werden, die in Wechselwirkung mit bestimmten (Membran-)Rezeptoren, einen effektiven gerichteten Transport vom ER-Lumen über den Golgi-Komplex ermöglicht.

Aufgrund der Ergebnisse läßt sich auch eine zweite Erklärungsmöglichkeit anführen.
2) Die ß-Lactamasesequenz verhindert die Ausbildung einer für die Sekretion günstigen Proteinstruktur der Invertasesequenzen in den Invertase-ß-Lactamasefusionen. Durch die Integration der Prosequenz des Alpha-Faktors in der Konstruktion pGRT2-6310 wird der Invertaseanteil von der ß-Lactamase getrennt. Die Prosequenz fungiert lediglich als "Abstandshalter". Hierdurch kann der Invertaseteil eine Proteinfaltung einnehmen, die einen positiven Effekt auf die Proteintranslokation ausübt; tatsächlich läßt sich diese Erklärungsmöglichkeit auch für die gesteigerte Sekretionseffizienz der ß-Lactamasefusion pHVOS14 anführen (vgl. Abschnitt 4.2.).

Um einen endgültigen Beweis zu erbringen, daß die Prosequenz des Alpha-Faktors tatsächlich eine Funktion für den Sekretionsvorgang besitzt, wurden von Teichman im Rahmen einer Diplomarbeit Deletionen innerhalb der Prosequenz in den Plasmiden pGRT1-913 und pGRT2-6310 eingeführt. Die Ergebnisse waren eindeutig. Die durch Deletionen veränderte Aminosäuresequenz des Profragmentes führten zu einer drastischen Erniedrigung der Sekretionseffizienzen der von den Plasmiden pGRT1-913 und pGRT2-6310 abgeleiteten Konstruktionen (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf). Der Prosequenz des Alpha-Faktors muß demnach die Funktion eines Sortiersignals zugeordnet werden.

Vergleicht man die Sekretionseffizienzen der beiden ß-Lactamasefusionen, kodiert durch die Konstruktionen pGRT1-913 und pGRT2-6310, so zeigt sich, das die intakte Preprosequenz des Alpha-Faktors zu einer höheren Sekretionseffizienz führt, als

ein isoliertes Prosegment innerhalb einer Invertase-ß-Lactamasefusion. Bei der Proteinfusion pGRT1-913 konnte eine Sekretionseffizienz von 90% ermittelt werden, während die Fusion pGRT2-6310 eine Sekretionseffizienz von 55% aufwies. In beiden Fusionen wird die ß-Lactamase offensichtlich an der gleichen Prozessierungsstelle innerhalb der Prosequenz prozessiert. Im Kulturmedium der GRF18/pGRT1-913 und pGRT2-6310 Transformanten konnte prozessierte aktive ß-Lactamase mit gleichen Molekulargewichten immunologisch nachgewiesen werden. In Zellaufschlüssen dieser Transformanten ließen sich core-glykosylierte Vorstufen nachweisen. Das Molekulargewicht des Vorläufermoleküls der Konstruktion pGRT1-913 beträgt 44500 Dalton, das der Konstruktion pGRT2-6310 88800 Dalton. Auch die Expression dieser Fusionen in kex2 Mutanten war vergleichbar. In beiden Fällen wurden unprozessierte hochglykosylierte ß-Lactamasefusionen ins Medium sezerniert wie Bindungsstudien an Concanavalin-A gezeigt haben.
Enzymatische und immunologische Daten zeigen, daß die ß-Lactamasekonzentration im Medium von GRF18/pGRT1-913 Transformanten fünf- bis zehnmal höher ist als im Medium von GRF18/pGRT2-6310 Transformanten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der Alpha-Promotor eine höhere Promotorenstärke aufweist als der Invertasepromotor. Bei gleicher Expressionsrate der Genfusionen pGRT1-913 und pGRT2-6310 dürfte die ß-Lactamasekonzentration im Medium von GRF18/pGRT2-6310 Transformanten aufgrund der Sekretionseffizienz von 55% nur 1,5 bis 2-fach niedriger ausfallen.

Die Daten zeigen, daß die Proteinfusionen in den Konstruktionen pGRT1-913 und pGRT2-6310 die gleichen Sekretionsschritte mit unterschiedlichen Sekretionsraten durchlaufen. Beide ß-Lactamasefusionen werden zunächst cotranslational ins ER-Lumen eingeschleust und core-glykosyliert. Die Proteine werden anschließend zum Golgi-Komplex transportiert und prozessiert. Ausgeschleust werden in GRF18 Zellen nur prozessierte ß-Lactamasemoleküle. In GRF18/pGRT1-913 Transformanten wird jedoch fünf- bis zehnmal mehr ß-Lactamase sezerniert. Dies ist zum einen zurückzuführen auf die Promotorenstärke des Alpha-Faktors, zum anderen auf eine hohe Sekretionseffizienz. Die Preprosequenzen sind offensichtlich so aufeinander abgestimmt, daß eine optimale Sekretionsrate nur bei intakter Preprosequenz, wie es in der Konstruktion pGRT1-913 der Fall ist, erfolgt (vgl. Abschnitt 4.4.).

4.4. Modell der Proteinsekretion in S.cerevisiae

Aus den Daten läßt sich zusammenfassend folgendes Modell der Proteintranslokation in S.cerevisiae ableiten. Für den Transfer sekretorischer Proteine ins ER-Lumen sind N-terminale Signal- bzw. Presequenzen verantwortlich (vgl. Einleitung). Dies konnte auch für die Signalsequenz der Invertase in einer erst kürzlich publizierten Arbeit klar gezeigt werden (Kaiser und Botstein, 1986). Die Signalsequenzen sind offensichtlich für einen effektiven Transport sekretorischer Proteine durch den Sekretionsweg der Hefe nicht ausreichend. Die Invertase-ß-Lactamasefusionen, vorgestellt in dieser Arbeit, enthalten

alle die vollständige Signalsequenz der Invertase; sie zeigen jedoch unterschiedliche Sekretionseffizienzen. Hieraus wird erkennbar, das noch zusätzliche Strukturen innerhalb des Proteins für den Sekretionsvorgang entscheidend sind. Für viele sekretorische Proteine ist dies möglicherweise die korrekte Ausbildung der Tertiär- bzw. gegebenenfalls Quartärstruktur innerhalb des ER-Lumens. Offensichtlich erfolgt im ER tatsächlich eine besondere Proteinfaltung, wie dies an einigen Proteinen gezeigt werden konnte. So können im Cytoplasma translatierte sekretorische Proteine unlöslich und enzymatisch inaktiv sein. Auch durch De- und Renaturierungsexperimente lassen sich einige dieser Proteine nicht aktivieren. Im Gegensatz hierzu sind diese Proteine löslich und enzymatisch aktiv, wenn sie cotranslational ins ER-Lumen eingeschleust werden. Als Beispiel kann die Expression des Prochymosins in Hefe angeführt werden (Smith et al., 1985). Durch diese besondere Proteinfaltung können Domänen ausgebildet werden, die in Wechselwirkung mit (Membran-)Rezeptoren als Sortiersignale fungieren. Möglicherweise ist diese Wechselwirkung für einige sekretorische Proteine artspezifisch; was erklären würde, warum artfremde Proteine in Hefe exprimiert zum Teil schlecht sezerniert werden. Dies trifft z.B. auch für das Prochymosin zu (Smith et al., 1985). Durch die Annahme, daß die Proteinfaltung entscheidend ist für die Sekretionseffizienz, ließe sich auch erklären, warum kleinste Veränderungen der Aminosäuresequenzen sekretorischer Proteine einen drastischen Effekt auf den Translokationsvorgang ausüben (Wu et al., 1983; Schauer et al., 1985; Bielefeld, Dissertation in Vorbereitung). Ferner können die Daten der Invertase-ß-Lactamasefusionen hierdurch interpretiert werden (vgl. Abschnitt 4.2).
Bei einigen sekretorischen Proteinen ist möglicherweise die zusätzliche Prosequenz für die Sekretion entscheidend. Diese Aminosäuresequenz könnte neben anderen Funktionen, wie z.B. Prozessierung und/oder enzymatische Aktivierung, auch zusätzlich die Funktion eines Sortiersignals für den Sekretionsprozeß ausüben. Dies trifft offensichtlich für die Prosequenz des Alpha-Faktors zu. Mit Hilfe der Preprosequenz konnte, wie bereits bei eukaryotischen sekretorischen Proteinen gezeigt (Emr et al., 1983;Brake et al., 1984; Bitter et al., 1984), eine hohe Sekretionseffizienz auch der ß-Lactamase in S.cerevisiae erzielt werden (vgl. 4.1.). Aus den experimentellen Daten geht hervor, daß die Preprosequenz eine funktionelle Einheit darstellt, die ausreichend ist für den effektiven Transfer der ß-Lactamase durch den Hefesekretionsweg. Auch die Integration der Prosequenz innerhalb einer Invertase-ß-Lactamasefusion übt eine positive Wirkung auf den Translokationsprozeß dieser Proteinfusion aus (vgl. 4.3.). Ferner führen Deletionen im Profragment der Plasmidkonstruktionen pGRT1-913 und pGRT2-6310 zu einer Herabsetzung der ß-Lactamasesekretion in S.cerevisiae (Teichman, Diplomarbeit Düsseldorf). Pre- und Prosequenz des Alpha-Faktors sind für den Translokationsvorgang aufeinander abgestimmt. Nur wenn diese Struktur in einer Proteinfusion intakt erhalten bleibt, wie z.B. in pGRT1-913, läßt sich eine optimale Sekretion nachweisen. Liegt die Prosequenz fast isoliert vor, wie in der Konstruktion pGRT2-6310, wo noch 2/3 der Presequenz benachbart zur Prosequenz vorliegen, ist die Sekretionseffizienz bereits nachweisbar herabgesetzt. Auch in diesem Fall muß daher angenommen werden, daß, wie bereits oben diskutiert wurde, nur eine korrekte

Tertiärstruktur der Preprosequenz einen wirkungsvollen Transfer von Fusionsproteinen bewerkstelligen kann, und diese Struktur nur ausgebildet wird, wenn die Funktionseinheit der Preprosequenz N-terminal mit einem Protein fusioniert wird. Der entscheidende Vorteil der Preprosequenz für Studien zur Proteinsekretion in S.cerevisiae besteht darin, daß diese Sequenz klar definiert und überschaubar ist. Möglicherweise lassen sich mit dieser Sequenz Bindungsstudien zu spezifischen (Membran-)Rezeptoren durchführen, was zu einer wesentlichen Bereicherung zum Verständnis der biochemischen und biophysikalischen Vorgänge der Proteinsekretion führen würde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Promotionsarbeit wurden Untersuchungen der Sekretion heterologer Proteine in der Hefe S.cerevisiae durchgeführt. Als Modellsystem diente die prokaryotische ß-Lactamase. Das Gen der ß-Lactamase wurde fusioniert mit der kodierenden DNA-Region der Preprosequenz des Alpha-Faktors, mit DNA-Sequenzen des SUC2-Gens und einer Kombination, bestehend aus einer DNA-Region des SUC2-Gens und der Preprosequenz des Alpha-Faktors. Die Expression dieser Genfusionen und die Sekretionseigenschaften der exprimierten Genprodukte wurden in transformierten Hefezellen enzymatisch und immunologisch untersucht.

Eine hohe Sekretionseffizienz der ß-Lactamase in S.cerevisiae konnte durch Fusion der Preprosequenz des Alpha-Faktors mit der ß-Lactamase erzielt werden. Auch die Integration der Prosequenz des Alpha-Faktors in eine Invertase-ß-Lactamasefusion führte zu einer guten Sekretionseffizienz. Offensichtlich fungiert die Prosequenz als Sortiersignal für den wirkungsvollen Transport durch den Hefe Sekretionsweg.
Eine hohe Expressionsrate der αFprepro-ß-Lactamasefusion konnte in Hefezellen des α-Paarungstyps nachgewiesen werden. Diese Hefezellen sezernieren während der Wachstumsphase bis zu 80 µg/µl aktive ß-Lactamase ins Medium. Etwa 90% der Gesamtaktivität der ß-Lactamase wurde im Kulturmedium gemessen.
Hefezellen, die mit der Invertase-αFpro-ß-Lactamasefusion transformiert wurden, sezernieren fünf- bis zehnfach weniger aktive ß-Lactamase. Die Enzymaktivität im Kulturmedium dieser Hefetransformanten beträgt 55% der Gesamtaktivität. Die Expression des Fusionsproteins erfolgt unabhängig vom Paarungstyp sowohl in a als auch α Zellen und unterliegt der Glucose-Repression/Derepression.
In beiden Konstruktionen wird eine kex2 abhängige Prozessierungsstelle innerhalb der Prosequenz erkannt. Sezerniert werden in transformierten GRF18 Hefezellen nur prozessierte ß-Lactamaseproteine. In kex2 Mutanten hingegen werden unprozessierte hochglykosylierte ß-Lactamasefusionsproteine ausgeschleust. Die Sekretionseffizienzen in GRF18 und kex2 Transformanten unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Die Prozessierung der Fusionsproteine ist für die Sekretion der Proteine nicht erforderlich.

Invertase-ß-Lactamasefusionen zeigten in Hefetransformanten unterschiedliche Sekretionseffizienzen. Die ß-Lactamaseaktivität im Kulturmedium betrug 20% der Gesamtaktivität. Nur in einer Invertase-ß-Lactamasefusion konnten 40% im Medium ermittelt werden. Offensichtlich beeinflussen die N-terminalen Invertasesequenzen den Translokationsprozeß. Die Anzahl der Glykosylierungssequenzen im Invertaseteil scheint für den Sekretionsvorgang keinen Einfluß auszuüben. Auch die Signalsequenz der Invertase ist vermutlich für einen wirkungsvollen Transport durch den Hefesekretionsweg allein nicht ausreichend. Die Ergebnisse weisen eher darauf hin, daß die Proteinstrukturen der unterschiedlichen Invertasefragmente den Sekretionsvorgang beeinflussen.

Gegenüber den ß-Lactamasefusionen, die die Prosequenz des Alpha-Faktors besitzen, zeigten die Invertase-ß-Lactamasefusionen mit Ausnahme der Konstruktion pHVOS14 wesentlich niedrigere Sekretionseffizienzen. Die Prosequenz des Alpha-Faktors scheint demzufolge einen positiven Effekt auf den Translokationsvorgang auszuüben.

Die in dieser Promotionsarbeit konstruierten ß-Lactamasehybridproteine zeigen jedoch alle die Eigenschaften sekretorischer Proteine. Sie werden cotranslational ins ER-Lumen eingeschleust und core-glykosyliert. In allen Fällen erfolgt ein Transfer zum Golgi-Komplex der Hefe; dies konnte nachgewiesen werden durch den Nachweis hochglykosylierter Invertase-ß-Lactamasefusionen und durch die Prozessierung der beiden ß-Lactamasekonstruktionen, die die Prosequenz des Alpha-Faktors besitzen. Ins Medium werden nur hochglykosylierte oder prozessierte ß-Lactmaseproteine sezerniert. Die Sekretion der ß-Lactamasefusionen erfolgt jedoch mit unterschiedlichen Sekretionseffizienzen.

6. Literaturverzeichnis

Achstetter T., and D.H. Wolf. (1985) Hormone processing and membrane-bound proteineases in yeast.
The EMBO Journal **4**, 173-177

Ambler, R.P. and G.K. Scott (1978) Partial amino acid sequence of penicillinase coded by Escherichia coli plasmid R6K.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 3732-3736

Bedouelle, H., P.J. Bassford, A.V. Fowler, J. Zabin, J. Beckwith, and M. Hofnung. (1980) Mutations which alter the function of the signal sequence of maltose-binding protein of Escherichia coli.
Nature (London) **285**, 78-81

Beggs, J.D. (1978) Transformation of yeast by replicating hybrid plasmid
Nature (London) **283**, 835-840

Benson, S.A., and T.J. Silhavy. (1983) Information within the mature LamB protein necessary for localization within the outer membrane of E.coli K12.
Cell **32**, 1325-1335

Benveniste, R. and J. Davies. (1973) Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria.
Ann. Rev. Biochem. **42**, 471-506

Berry-Lowe, S.L., T.D. Mc Knight, D.M. Shah, and R.B. Heagher. (1982) The nucleotide sequence, expression and evolution of one member of a multigene family encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in soybean.
J. Mol. Appl. Genet. **1**, 483-498

Betz R., T.R. Manney, and W. Duntze. (1981) Hormone control of gametogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae.
Gamete Res., **4**, 571-584

Birnboim, H.C. and J. Doly. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Research 7, 1513-1523

Bitter, G.A., K.K. Chen, A.R. Banks, and P.-H.Lai. (1984) Secretion of foreign proteins from Saccharomyces cerevisiae directed by alpha-factor gene fusions
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 5330-5334

Blobel, G. (1980) Intracellular protein topogenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1496-1500

Blobel, G., and B. Dobberstein. (1975a) Transfer of proteins across membranes. I.Presence of proteolytically processed and nonprocessed nascent immunoglobulin light chains on membranebound ribosomes of murine myeloma.
J. Cell Biol. **67**, 835-851

Blobel, G., and B. Dobberstein. (1975b) Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components.
J. Cell Biol. **67**, 852-862

Blobel, G., and D.D. Sabatini. (1971) Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells.
In Biomembranes. L.A. Mauson, editor. Plenum Publishing Corp.,New York. **2**, 193-195

Bolivar, R., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa, S. Falkow. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose system. Gene **2**, 95-113

Bolivar, F. (1978) Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules.
Gene **4**, 121-136

Boone, C., H. Bussey, D. Greene, D.Y. Thomas and T. Vernet. (1986) Yeast killer toxin: Site-directed mutations implicate the precursor protein as the immunity component.
Cell **46**, 105-113

Brake, A.J., D.J. Julius, and J. Thorner. (1983) A Functional Prepro-alpha-factor gene in Saccharomyces yeasts can contain three, four, or five repeats of the mature pheromone sequence.
Mol. Cell. Biol. **3**, 1440-1450

Brake, A.J., J.P. Merryweather, D.G. Coit, U.A. Heberlein, F. R. Masiarz, G.T. Mullenbach, M.S. Uredea, P. Valenzuela, and P.J. Barr. (1984) Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in Saccharomyces cerevisiae.
Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A, **81**, 4642-4046

Brake, A.J., C. Brenner, R. Najarian, P. Laybourn and J. Merryweather. (1985) Structure of genes encoding precursors yeast peptide mating pheromone a-factor. In Protein Transport and Secretion, M.J. Gething (ed.).
(Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 103-108

Brown, W.J., and M.C. Farquhar. (1984) The mannose-6-phosphate receptor is concentrated in cis Golgi cistaernae.
Cell **36**, 295-307

Burstein, Y., and I. Schechter. (1978) Primary structure of N-terminal extra peptide segments linked to the variable and constant regions of immunoglobulin light chain precursor.
Biochemistry **17**, 2392-2400

Carlson, M., and D. Botstein. (1982) Two differentially regulated mRNAs with different 5'-ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase.
Cell **28**, 145-154

Carlson, M., R. Taussig, S. Kustu and D Botstein. (1983) The secreted form of invertase in Saccharomyces cerevisiae is synthesized from mRNA encoding a signal sequence.
Mol. Cell. Biol. **3**, 439-447

Chang, C.N., M. Matteucci, L.J. Perry, J.J. Wulf, C.Y. Chen and R.A. Hitzeman. (1986) Saccharomyces cerevisiae secretes and correctly processes human interferon hybrid proteins containing yeast invertase signal peptides.
Mol. Cell. Biol. **6**, 1812-1819

Chua, N.-H., and G. W. Schmidt. (1978) Post-translational transport into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit (s) of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 6110-6114

Chua, N.-H., and G. W. Schmidt. (1979) Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts.
J. Cell Biol. **81**, 461-483

Clewell, D.B. and D.R. Helinski. (1969) Supercoiled DNA protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular form.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **62**, 1159-1166

Coruzzi, G., R. Broglie, A.R. Cashmore and N.-H. Chua. (1983) Nucleotide sequences of two pea cDNA clones encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and major chlorophyll a/b-binding thylakoid polypeptide
J. Biol. Chem. **258**, 1399-1402

Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards, and N.-H. Chua. (1984) Issue-spezific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase.
The EMBO Journal **3**, 1671-1679

Dauffaud G.D., S.K. Lehnhardt, P.E. March, and M. Inouye. (1985) Structure and function of the signal peptide. In Membrane protein biosynthesis and turnover. P. A. Knauf and J.S. Cook (ed.).
Current Topics in Membranes and Transport. Acad. Press New York **24**, 65-104

Devillers-Thiery, A., T. Kindt, G. Scheele, and G. Blobel. (1975) Homology in amino terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteines.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **72**, 5016-5020

Dobberstein, B., G. Blobel, and N.-H. Chua. (1977) In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of Chlamidomonas reinhardii.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 343-347

Dobberstein, B., H. Garoff , G. Warren, and P.J. Robinson. (1979) Cell free synthesis and membrane insertion of mouse H2d histocompatibility antigen and beta 2-microglobulin. Cell **17**, 759-769

Dretzen, G., M. Bellard, P. Sassone-Corsi, and P. Chambon. (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Analytical Biochemistry **112**, 295-298

Dunsmuir, P., S. Smith and J. Bedbrook. (1983) A number of different nuclear genes for small subunit of RuBPCase are transcribed in petunia Nucleic Acids Res. **11**, 4177-4183

Duskin ,D. and W.C. Mahoney. (1982) Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. J. Biol. Chem. **257**, 3105-3109

Ellis, R.J. (1981) Chloroplase proteins: Synthesis, transport and assembly. Ann. Rev. Plant Physiol. **32**, 111-137

Emr, S.D., and T.J. Silhavy. (1980a) Mutations affecting location of an Escherichia coli outer membran protein, the bacteriophage lambda receptor. J.Mol.Biol. **141**, 63-90

Emr, S.D., J. Hedgpeth, J.M. Clement, T.J. Silhavy, and M. Hofnung. (1980b) Sequence analysis of mutations that prevent export of lambda receptor, an Escherichia coli outer membrane protein. Nature (London) **285**, 82-85

Emr, S.D., and T.J. Silhavy. (1982) Molecular components of signal sequence that function in the initiation of protein export. J. Cell Biol. **95**, 689-696

Emr, S.D., R. Schekman, M.C. Flessel and J.Thorner. (1983) An MFα 1-SUC2 (α-factor-invertase) gene fusion for study of protein localisation and gene expression in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci USA **80**, 7080-7084

Emr, S.D., I. Schauer, W. Hansen, P. Esmon and R. Schekman. (1984) Invertase ß-galactosidase hybrid proteins fail to be transported from the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. **4**, 2347-2355

Erickson, A.H., and G. Blobel. (1979) Early events in the biosynthesis of the lysosomal enzyme cathepsin D. J. Biol. Chem. **254**, 11771-11774

Erhart, E. and C.P. Hollenberg. (1981) Curing of Saccharomyces cerevisiae 2-µm DNA by transformation. Curr. Genet. **3**, 83-89

Esmon, B., P. Novick and R. Schekman. (1981) Compartmentalized assembly of oligosaccharides on exported glycoproteins in yeast.
Cell **25**, 451-460

Farquhar, M. and G. Palade. (1981) The golgi apparatus (complex) - (1954-1981)- from artifact to center stage.
J. Cell Biol. **91**, 77-103

Fergunson, A.R., T. Katsunuma, H. Betz and H. Holzer. (1973) Purification ans properties of an inhibitor of the tryptophan-synthase-inactivating enzymes in yeast.
Eur. J. Biochem. **32**, 444-450

Ferro-Novick, S., W. Hansen, I. Schauer, and R. Schekman. (1984a) Genes required for complementation of import of proteins into the endoplasmic reticulum in yeast.
J. Cell Biol. **98**, 44-53

Ferro-Novick, S., P. Novick, C. Field, and R. Schekman. (1984b) Yeast secretory mutants that block the formation of active cell surface enzymes.
J. Cell Biol. **86**, 123-128

Fries, E., L. Gustafsson and P.A. Peterson. (1984) Four secretory proteins synthesized by hepatocytes are transported from endoplasmic reticulum to Golgi complex at different rates
The EMBO Journal **3**, 147-152

Gascon, S., N.P. Neumann and J.O. Lampen. (1968) Comparative study of properties of purified internal and external invertase from yeast.
J. Biol. Chem. **243**, 1573-1577

Garoff, H. (1985) Using recombinant DNA techniques to study protein targeting in eucaryotic cell.
Ann. Rev. Cell Biol. **1**, 403-445

Garoff, H., K. Simons, and B. Dobberstein. (1978) Assembly of the semliki forest virus membrane glycoproteins in the membrane of the endoplasmic reticulum in vitro.
J. Mol. Biol. **124**, 587-600

Gething, M.-J., and J. Sambrook. (1982) Construction of influenca haemaglutinin genes that code for intracellular and secerted forms of the protein.
Nature (London) **300**, 598-603

Gibson, R., R. Leavitt, S. Kornfeld, and S. Schlesinger. (1978) Synthesis and infectivity of vesicular stomatitis virus containing non-glycosylated G protein.
Cell **13**, 671-679

Gilmore, R., G. Blobel, and P. Walter. (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle.
J. Cell Biol. **95**, 463-469

Goldman, B. M., and G. Blobel. (1978) Biosynthesis of peroxysomes: Intracellular site of synthesis of catalase and uricase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 5066-5070

Green, R.F., H.K. Meiss, and E. Rodriguez-Boulan. (1981) Glycosylation does not determine segregation of viral glycoproteins in the plasma membrane of epithalial cells.
J. Cell Biol. **89**, 230-239

Grossmann, M.K. and F. Maley. (1979) Subunit structure of external invertase from Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. **175**, 223-229

Grossmann, M.K. and F.K. Zimmermann. (1979) The structural genes of internal invertase in Saccharomyces cerevisiae.
Molec. gen. Genet. **175**, 223-229

Guan J.-L., C.E. Machamer and J.K. Rose. (1985) Glycosylation allows cell-surface transport of an anchored secretory protein.
Cell **42**, 489-496

Hackel, R.A. (1975) Genetic cotrol of invertase formation in Saccharomyces cerevisiae. I. Isolation and characterisation of mutants affecting sucrose utilization.
Mol. Gen. Genet. **140**, 361-370

Hasilik, A., and E. Neufeld. (1980a) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts-synthesis as precursors of higher molecular weight.
J. Biol. Chem. **255**, 4937-4945

Hasilik, A., and E. Neufeld. (1980b) Biosynthsis of lysosomal enzymes in fibroblasts-phosporylation of mannose residues.
J. Biol. Chem. **255**, 4946-4950

Hemmings, B. A., G. S. Zubenko, A. Hasilik, and E. W. Elizabeth. (1981) Mutant defective in processing of an enzyme located in the lysosome-like vacuole of Saccharomyces cerevisiae.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**, 435-439

Herbert E. and M. Uhler. (1982) Biosynthesis of polyprotein precursors to regulatory peptides.
Cell **30**, 1-2

Hicks, J.B., A. Hinnen, and G.R. Fink. (1979) Properties of the yeast transformation.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. **43**, 1305-1313

Hinnen, A., J.B. Hicks, and G.R. Fink. (1978) Transformation of yeast
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 1929-1933

Hitzeman R.A., D.W. Leung, L.J. Perry, W.J. Kohr, H.L. Levine, D.V. Goeddel (1983) Secretion of human interferons by yeast.
Science **219**, 620-625

Hollenberg, C.P. (1979a) The expression in Saccharomyces cerevisiae of bacterial ß-Lactamase and other antibiotic resistence genes integrated in a 2-um DNA vector. In: Extrachromosomal DNA, eds. D.J. Cummings, P. Borst, J.B. Dawid, S.M. Weissmann & C.F. Fox.
ICN-UCLA Symp. on Molecular ans Cellular Biology **15**, 325-338

Hollenberg, C.P. (1979b) The expression of bacterial antibiotic resistance genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. In: Plasmids of Medical, Enviromental and Commercial Importans, eds. K.N. Timmis, A. Pühler, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 481-494

Hollenberg, C.P., R. Roggenkamp, G. Reipen and M. Bielefeld. (1985) Synthesis and secretion of foreign gene products in the yeast Saccharomyces cerevisiae. In "Quo Vadis" Therapeutic agents produced by genetic engineering, edited by A. Joyeaux, G. Leygue, M. Morre, R. Roncucci, R. Schmelck, P.H. SANOFI Recherche, Montepellier, France 65-78

Hollenberg C.P., G. Reipen, M. Bielefeld, R. Teichman and R. Roggenkamp (1986) Processing and secretion of bacterial ß-Lactamase fusions in yeast. (in press)

Horwich, A.L., F. Kalousek, I. Mellman, and L.E. Rosenberg. (1985) A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein.
The EMBO Journal, **4**, 1129-1135

Hubbard, S.C., and R.J. Ivatt. (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides.
Annu. Rev. Biochem. **50**, 555-583

Hunt, L.A., J.A. Etchison, and D.F. Summers. (1978) Oligosaccharide chains are trimmed during synthesis of the envelope glycoprotein of vesicular stomatitis virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 754-758

Hurt, E.C., B. Pesold-Hurt and G. Schatz . (1984) The aminoterminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix.
The EMBO Journal **3**, 3149-3156

Hurt, E.C., U. Müller, and G. Schatz. (1985) The first twelve amino acids of a yeast mitochondrial outer membrane protein can direct a nuclear-encoded cytochrome oxidase subunit to the mitochondrial inner membrane
The EMBO Journal, **4**, 3509-3518

Jamieson, J.D., and G. Palade. (1971) Synthesis, intracellular transport and discharge of secretory proteins in stimulated exocrine cells.
J. Cell Biol. **50**, 135-158

Jamieson, J.D., and G.E. Palade. (1977) Production of secretory proteins in animal cells.
Int. Cell Biol. 308-317

Julius D., L. Blair, A. Brake, G. Sprague, and J. Thorner. (1983) Yeast alpha factor is processed from a larger precursor polypeptide: The essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase
Cell **32**, 839-852

Julius D., R. Schekman, and J. Thorner. (1984a) Glycosylation and Processing of Prepro-alpha-factor through the yeast secretory pathway.
Cell **36**, 309-318

Julius D., A. Brake, L. Blair, R. Kunisawa, and J. Thorner. (1984b) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor.
Cell **37**, 1075-1089

Kadonaga, J. T., A. E. Gautier, D.R. Straus, A. D. Charles, M. D. Edge, and J. R. Knowles (1984) The role of the ß-Lactamase signal sequence in the secretion of proteins by Escherichia coli.
J. Biol. Chem. **259**, 2149-2154

Kaiser, C.A. and D. Botstein (1986) Secretion-defective mutations in the signal sequence for Saccharomyces cerevisiae invertase.
Mol. Cell. Biol. **6**, 2382-2391

Kaschnitz, R., and G. Kreil. (1978) Processing of prepromelittin by subcellular fractions from rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **83**, 901-907

Kellermann E., P.G. Seeboth and C.P. Hollenberg. (1986) Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from Saccharomyces cerevisiae.
Nucleic Acids Research **14**, 8963-8977

Kemper, B., J.F. Habener, R.C. Mulligan, J.T. Jr. Potts, and A. Rich. (1974) Preproparathyroid hormone: a direct translation product of a parathyroid messenger RNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **71**, 3731-3735

Koshland, D., and D. Botstein. (1980) Secretion of Beta-Lactamase requires the carboxy end of the protein.
Cell **20**, 749-760

Koshland, D., R.T. Sauer, and D. Botstein. (1982) Diverse effects of mutations in the signal sequence on the secretion of beta-lactamase in Salmonella typhimurium.
Cell **30**, 903-914

Krangel, M.S., H.T. Orr, and J.L. Strominger. (1979) Assembly and maturation of HLA-A and HLB-B in vivo.
Cell **18**, 979-991

Kreil, G., L. Haiml and G. Suchanek. (1980a) Stepwise cleavage of the pro part of promellitin by dipeptidylaminopeptidase IV: evidence for new type of precursor-product conversion. Eur. J. Biochem. **111**, 49-58

Kreil, G., C. Mollay, P. Kaschnitz, L. Haiml and V. Vilas. (1980b) Prepromellitin specific cleavage of pre- and pro-parts in vitro. Ann. NY Acad. Sci. **343**, 338-346

Kurjan, J., and I. Herskowitz. (1982) Structure of a yeast pheromone gene (MFα): a putative α-factor precursor contains four tandem copies of mature α-factor. Cell **30**, 933-943

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685

Leblond, C.P., and G. Bennett. (1977) Role of the Golgi apparatus in terminal glycosylation. Int. Cell Biol. 326-336

Leibowitz, M.J. and R.W. Wickner. (1976) A chromosomal gene required for killer plasmid expression, mating and sporulation in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73**, 2061-2065

Lingappa, V.R., F.N. Katz, M.F. Lodish, and G. Blobel. (1978) A signal sequence for the insertion of a transmembrane glycoprotein. Similarities to the signals of secretory proteins in primary structure and function. J. Biol. Chem. **253**, 8667-8670

Lodish,H.F., W.A. Braell, A.L. Schwartz, G.J.M. Strous, and A. Zielberstein. (1981) Synthesis and assembly of membrane and organelle proteins. Int. Rev. Cytol. Suppl. **12**, 247-307

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. (1951) Protein measuremant with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275

Machamer, C.E., R.Z. Florkiewicz and J.K. Rose.(1985) A single N-linked oligosaccharide at either of the two normal sites is sufficient for cell surface expression of VSV G protein. Mol. Cell. Biol. 3074-3083

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. (1982) Molecular cloning: A labaratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory

Maccecchini, M.-L., Y. Rudin, G. Blobel, and G. Schatz. (1979a) Import of proteins into mitochondria: Precursor forms of the extramitochondrially made F1-ATPase subunits in yeast.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 343-347

Maccecchini, M.-L., Y. Rudin, and G. Schatz. (1979b) Transport of proteins across the mitochondrial outer membrane. A precursor form of the cytoplasmically intermembrane enzyme cytochrome c peroxydase.
Chem. **254**, 7468-7471

Mandel, M. and A. Higa. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.
J. Mol. Biol. **53**, 159-162

Maxam, A.M. and W. Gilbert. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.
Methods Enzymol. **65**, 500-560

Meyer, D.J., E. Krause, and B. Dobberstein. (1982) Secretory protein translocation across membranes -the role of the "docking protein".
Nature (London) **297**, 647-650

Milstein, C., G.G. Brownlee, T.M. Harrison, and M.B. Mathews. (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains.
Nature New Biol. **239**, 117-120

Moir, D.T., J. Mao, M.J. Duncan, R.A. Smith and T. Kohno. (1985) In Developments in Industrial Microbiology, L. Lenderkofler (ed.). Society for Industrial Microbiology **26**, 75-85

Moreno,F., A.V. Fowler, M. Hall, T.J. Silhavy, S. Zabin, and M. Schwartz. (1980). A signal sequence is not sufficient to lead ß-galactosidase out of the cytoplasm.
Nature (London) **286**, 356-359

Mortin, G., and I. Boime. (1981) Miscleavage of the presequence of rat preprolactin synthesized in pittutary cells incubated with threonin analog
Cell **24**, 453-461

Müller M., J, Ibrahimi, C.N. Chang, P. Walter and G. Blobel. (1982) A bactrial secetory protein requires signal recognition particle for translocation across mammalian endoplasmic reticulum.
J. Biol. Chem. **257**, 11860-11863

Nagasawa, T., H. Nagasawa-Fujimori, and P.C. Heinrich (1979) Hydrophobic interactions of cytochrome c oxydase.
Eur.J. Biochem. **94**, 31-39

Neupert, W. (1983) Transfer of proteins into and across the membranes of mitochondria. In New Perspectives on Membrane Dynamics. Proc. CNRS-INSERM Int. Symp. NATO Workshop, Strasbourg: French Biochem.Soc. 246-248

Neumann,N.P. and J.O. Lampen (1967) Purification and properties of yeast invertase.
Biochemistry **6**, 468-475

Nicaud J.-M., N. Mackman and J.B. Holland. (1986) Current status of secretion of foreign proteins by microorganisms.
Journal of Biotechnology **3**, 255-270

Novick, P., C. Field, and R. Schekman. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway.
Cell **21**, 205-215

O'Callaghan C.M., A. Morris, S.M. Kirby, A.H. Shingler. (1972) Novel method for detection of ß-Lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy **1**, 283-288

Olden, K., J.B. Parent and S.L. White. (1982) Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function.
Biochim. Biophys. Acta **650**, 209-232

Parodi, A.J., and L.F. Leloir. (1979) The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eukaryotic cell.
Biochim. Biophys. Acta **559**, 1-37

Perlman, D., H.O. Halvorson, and E. Cannon. (1982) Presecretory and cytoplasmic invertase polypeptides encoded by distinct mRNAs derived from the same structural gene differ by a signal sequence.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 781-785

Perlman, D., and H.O. Halvorson. (1983) A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic signal peptides.
J. Mol. Biol. **167**, 391-409

Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis.
Science **189**, 347-358

Poyton, R.O. (1983) Memory and membranes: The expression of genetic and spatial memory during the assembly of organelle macrocompartments.
In Modern Cell Biology, Liss, New York **2**, 15-22

Poyton, R.O., and E.McKemmie. (1979) A polyprotein precursor to all four cytoplsmically translated subunits of cytochrome c oxidase from Saccharomyces cerevisiae.
J. Biol. Chem. **254**, 6763-6771

Rapoport, T.A., and M. Wiedemann. (1985) Application of signal hypothesis to the incorporation of integral membrane proteins. In Membrane protein biosynthesis and turnover. P.A. Knauf and J.S. Cook (ed.).
Current Topics in Membranes and Transport
Acad. Press New York **24**, 1-63

Rasmussen, B.A., V.A. Bankaitis, and P.J., Jr. Bassford. (1984) Export and processing of MalE-LacZ hybrid proteins in Escherichia coli.
J. Bacteriol. **160**, 612-617

Redman, C.M., and D.D. Sabatini. (1966) Vectorial discharge of peptides released by puromycin from attached ribosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **56**, 608-615

Redman, C.M., P. Siekevitz, and G.E. Pallade. (1966) Sythesis and transfer of amylase in pigeon pankreatic microsomes.
J. Biol. Chem. **241**, 1150-1158

Reipen G., E. Erhart, K.D. Breunig, and C.P. Hollenberg. (1982) Non-selective transformation of S.cerevisiae.
Curr. Genet. **6**, 189-193

Reitman, M., and S. Kornfeld. (1981) UDP-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase: Proposed enzyme for the phosporylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes.
J. Biol. Chem. **256**, 4275-4281

Riezman H., R. Hay, C. Witte, N. Nelson, and G. Schatz. (1983) Yeast mitochondrial outer membrane specifically binds cytoplasmically-synthesized precursors of mitochondrial proteins.
The EMBO Journal **2**, 1113-1118

Robbins, P.W., C. Hubbard, S.J. Turco, and D.F. Wirth. (1977) Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the sythesis of membrane glycoproteins.
Cell **12**, 893-900

Roggenkamp, R., J. Hoppe, and C.P. Hollenberg. (1983) Specific processing of the bacterial ß-Lactamase precursor in Saccharomyces cerevisiae
J. Cell. Biochem. **22**, 141-149

Roggenkamp, R., H. Dagartz, and C.P. Hollenberg (1985). Precursor of ß-Lactamase is enzymatically inactive. Accumulation of the pre-protein in Saccharomyces cerevisiae
J. Biol. Chem. **260**, 1508-1512

Roggenkamp, R., G. Reipen, and C.P. Hollenberg. (1986) Yeast translocation signals mediate transport of ß-Lactamase through the inner membrane of Escherichia coli. A sensitive method for the detection of signal sequences.
J. Bacteriol. **168**, 467-469

Rosenfeld, M.G., G. Kreibich, D. Popov, K. Kato, and D.D. Sabatini. (1982) Biosynthesis of lysosomal hydrolases: Their synthesis in bound polysomes and the rore of co- and post-translatinal processing in determining their subcellular distribution.
J. Cell Biol. **93**, 135-143

Roth, M.G., J. Fitzpatrick, and R.W. Compans. (1979) Polarity of influenza and vesicular stomatitis virus maturation in MDCK cells: Lack of requirement for glycosylation of viral glycoproteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 6430-6434

Rothblatt A.J. and D.J. Meyer (1986) Secretion in yeast: Reconstitution of the translocation and glykosylation of α-Factor and invertase in a homologous cell-free system
Cell **44**, 619-628

Rothman, J.E., and H.F. Lodish. (1977) Synchronized transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein.
Nature (London) **269**, 775-780

Sabatini, D.D., Y. Tashiro, and G.E. Palade. (1966) On the attachmnent of ribosomes to microsomal membranes.
J. Mol. Biol. **19**, 503-524

Sabatini, D.D., and G. Blobel. (1970) controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II. Location of the polypeptides in rough microsomes.
J. Cell. Biol. **45**, 146-157

Schachter,H., and S. Roseman. (1980) Mammalian glycosyl-transferases. In "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" W. Lennarz, (ed.), 85-160. Plenum, New York

Schauer, I., S. Emr, C. Gross, and R. Schekman. (1985) Invertase Signal and Mature Sequence Substitutions that delay intercompartmental transport of active enzyme.
J. Cell Biol. **100**, 1664-1675

Schechter, J. (1973) Biologically and chemically pure mRNA coding for mouse immunoglobulin L.-chain prepared with the aid of antibodies and immobilized oligothymidine.
Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. **70**, 2256-2260

Schekman, R. (1982) The secretory pathway in yeast.
Trends Biochem. Sci. **7**, 243-246

Schekman, R. and P. Novick. (1982) The secretory process and yeast cell surface assembly. In J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach (ed.), The molecular biology of the yeast Sacharomyces, vol.2.
Cold Spring Harbor Labaratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 361-393

Schmelzer, E., and P.C. Heinrich. (1980) Synthesis of a large precursor for the subunit IV of rat liver cytochrome c oxidase in a cell-free wheat germ system.
J. Biol. Chem. **255**, 7503-7506

Silver P.A., L.P. Keegan, and M. Ptashne. (1984) Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**, 5951-5955

Silhavy, T.J., S.A. Benson and S.D. Emr. (1983) Mechanisms of protein localization.
Microbiol. Rev. **47**, 313-344

Skipper, N., D.Y. and P.C.K. Lau. (1984) Cloning and sequencing of the preprotoxin-coding region of the yeast M1 double stranded RNA.
The EMBO Journal **3** 107-111

Smith, R.A., M.J. Duncan, and D.T. Moir. (1985) Heterologous Protein Secretion from Yeast.
Science. **229**, 1219-1224

Steiner D.F., P.S. Quinn, S.J. Chan, J. Marsh and H.S. Tager. (1980) Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins.
Ann. NY Acad. Sci. **343**, 1-16

Strous, G.J.A.M., and H.F. Lodish. (1980) Intracellular transport of secretory and membrane proteins in hematoma cells infected by vesicular stomatitis virus.
Cell **22**, 709-717

Struhl, K., D.T. Stinchcomb, S. Scherer, and R.W. Davis. (1979) High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 4559-4563

Sutcliffe, J.G. (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of Escherichia coli plasmid pBR322
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 3737-3741

Sutton, P.D. and J.O. Lampen. (1962) Localization of sucrose and maltose fermenting systems in Saccharomyces cerevisiae.
Biochim. Biophys. Acta **56**, 303-312

Swan, D., H. Aviv, and P. Leder. (1972) Purification and properties of biologically messenger RNA for myeloma light chain.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **69**, 1967-1977

Tabas, J., S. Schlesinger and S. Kornfeld. (1978) Processing of high mannose oligosaccharides to form complex type oligosaccharides on the newly synthesized polypeptides of the visicular stomatitis virus G protein and the IgG heavy chain.
J. Biol. Chem. **253**, 716-722

Tabas, I., and S. Kornfeld. (1980) Biosynthetic intermediates of beta-glucuronidase contain high mannose oligosaccharides with blocked phosphate residues.
J. Biol. Chem. **255**, 6633-6639

Talmadge, K., S. Stahl, and W. Gilbert. (1980) Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 3369-3373

Tarentino A.L., T.H. Jr. Plummer and F. Maley. (1974) The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo-beta-N acetyl glucosaminidase.
J. Biol. Chem. **249**, 818-824

Taussing, R. and M. Carlson. (1983) Nucleotide sequence of the yeast SUC2 gene for invertase.
Nucleic Acids Research **11**, 1943-1945

Thorner, J. (1981) Pheromonal regulation of developement in Saccharomyces cerevisiae. In Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance, J.N. Strathern, E. W. Jones and J. R. Broach (ed). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory , 143-180

Towbin, H. T. Staehelin, J. Gordon. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354

Trimble, R.B. and F. Maley. (1977). Subunit structure of external invertase from Saccharomyces cerevisiae.
J. Biol. Chem. **252**, 4409-4412

Trimble, R.B. and F. Maley. (1984) Deglycosylation by endo-ß-N-Acetylglucosiminidase H.
Anal. Biochem. **141**, 515-522

Tsai, H., J. H. J. Tsai and P. H. Yu. (1973) Effet of yeast proteinase and its inhibitors on the inactivation of tryptophan synthase from Saccharomyces cerevisiae and Neurospora crassa.
Eur. J. Biochem. **40**, 225-233

Tschumper, C. and J. Carbon. (1980) Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene.
Gene **10**, 157-166

Varki, A., and S. Kornfeld. (1980) Identification of a rat liver N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase capabel of removing "blocking" N-acetylglucosamine residues from phosphorylated high mannose oligosaccharides of lysosomal enzymes.
J. Biol. Chem. **255**, 8398-8401

Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in vitro assembled polysomes sythesizing secretory protein.
J. Cell Biol. **91**, 545-550

Walter, P., and G. Blobel. (1980) Purification of membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum.
Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 7112-7116

Walter, P., and G. Blobel. (1981a) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein.
J. Cell Biol. **91**, 551-556

Walter, P., and G. Blobel. (1981b) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. III. Signal recognition protein (SRP) cause sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that released by microsomal membranes.
J. Cell Biol. **91**, 557-561

Walter, P., and G. Blobel. (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum.
Nature (London) **299**, 691-698

Wiedman M., A. Huth and T.A. Rapoport. (1984) Xenopus oocytes can secrete bacterial ß-Lactamase
Nature **309**, 637-639

Winter, P. (1986) Therapie der Oenothera hookerii Plastommutante Sigma durch kompartimentfremden Gentransfer
Dissertation, Universität Düsseldorf

Wu,G.E., N. Hozumi and H Murialdo. (1983) Secretion of a Lamda$_2$ immunoglobulin chain is prevented by a single amino acid substitution in its variable region.
Cell, **33**, 77-83

Yost, C.S., J. Hedgpeth, and V.R. Lingappa. (1983) A stop transfer sequence confers predictable transmembrane orientation to previously secreted protein in cell-free systems.
Cell **34**, 759-760

7. Abkürzungen

A	- Absorption
A	- Adenin (bei Angaben von Basensequenzen)
Ala	- Alanin
Amp	- Ampicillin
Amp^r	- Ampicillinresistenz
Arg	- Arginin
As	- Aminosäure(n)
Asn	- Asparagin
Asp	- Asparaginsäure
ATP	- Adenosintriphosphat
Bp	- Baasenpaar
C	- Cytosin (bei Angaben von Basensequenzen)
Cm	- Chloramphenicol
Cm^s	- chloramphenicolsensitiv
dATP	- Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	- Desoxycytidintriphosphat
dGTP	- Desoxyguanosintriphosphat
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
dTTP	- Desoxythymidintriphosphat
EDTA	- Ethylendinitrilotetraacetat
EndoH	- Endoglycosidase H
G	- Guanin (bei Angaben von Basensequenzen)
x g	- Vielfaches der Erdbeschleunigung
Glu	- Glutaminsäure
Gly	- Glycin
h	- Stunde
His	- Histidin
Kb	- Kilobasenpaar
KDa	- Kilo Dalton
Leu, leu	- Leucin
mRNA	- messenger RNA
min	- Minute
mU	- Milliunits
n.b.	- nicht bestimmt
NADH	- reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid
OD	- optische Dichte
PA	- Polyacrylamid
PEG	- Polyethylenglykol
PMSF	- Phenylmethylsulfonylfluorid
sec.	- Sekunde
Ser	- Serin
SDS	- Natriumdodecylsulfat
T	- Thymin (bei Angaben von Baasensequenzen)
Tc, Tet	- Tetrazyklin
Tc^r	- tetrazyklinsesistent
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	- Tryptophan
U	- Unit (Enzymeinheit)
UpM	- Umdrehungen pro Minute
Ura	- Uracil

Lebenslauf

Gernot Reipen, Am Haferkamp 35, 4000 Düsseldorf 13

Geburtstag/-ort:	23. September 1953, Glehn
Eltern:	Josef Reipen, Marianne Reipen, geb. Caster
Familienstand:	ledig

Schulbildung:	1960-1965 Grundschule Bedburdyck 1965-1973 Kreis-Gymnasium Grevenbroich 1973 Abitur
Wehrdienst:	1973-1975 Soldat auf Zeit
Hochschulstudium:	1975-1982 an der Universität Düsseldorf, Abschluß: Diplom im Fachbereich Biologie, Hauptfach Mikrobiologie Juli 1982 Beginn der Promotion im Institut für Mikrobiologie an der Universität Düsseldorf

Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg danke ich für die Anregung dieser Arbeit, seine Betreuung und Förderung bei ihrer Durchführung.

Frau Martina Bielefeld, Herrn Dr. Rainer Roggenkamp und Herrn Raphael Teichman danke ich für viele anregende Diskussionen und das Interesse an dieser Arbeit. Frau Jutta Hagedorn danke ich besonders für ihr Korrekturlesen und für ihre Mithilfe bei den photographischen Arbeiten.

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Hollenberg, C.P., R. Roggenkamp, G. Reipen and M. Bielefeld. (1985) Synthesis and secretion of foreign gene products in the yeast Saccharomyces cerevisiae. In "Quo Vadis" Therapeutic agents produced by genetic engineering, edited by A. Joyeaux, G. Leygue, M. Morre, R. Roncucci, R. Schmelck, P.H. SANOFI Recherche, Montepellier, France 65-78

Roggenkamp, R., G. Reipen and C.P. Hollenberg. (1986) Yeast translocation signals mediate transport of ß-Lactamase through the inner membrane of Escherichia coli. A sensitive method for detection of signal sequences.
J. Bacteriol. **168**, 467-469